



# Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes

Mohamed Kettani Halabi

## ► To cite this version:

Mohamed Kettani Halabi. Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI; Université Hassan II (Mohammedia, Maroc). Faculté des sciences et techniques, 2012. Français. NNT : 2012PA112230 . tel-01070631

**HAL Id: tel-01070631**

**<https://theses.hal.science/tel-01070631>**

Submitted on 2 Oct 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE HASSAN II MOHAMMEDIA - CASABLANCA

## Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD**  
et  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HASSAN II MOHAMMEDIA – CASABLANCA**

Présentée par :

**M. Mohamed KETTANI HALABI**

Spécialité : **Biologie**

Sujet de la thèse :  
**Etude de la diversité de *Pectobacterium spp* et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes**

Thèse présentée et soutenue à Mohammedia le 22 septembre 2012 devant le jury composé de :

<b>Michel DRON</b>	<i>Professeur d'Enseignement Supérieur Directeur de l'IBP – Paris, France</i>	<i>Président</i>
<b>Mouncef BENCHEKROUN</b>	<i>Professeur d'Enseignement Supérieur Directeur du CED -FST Settat, Maroc</i>	<i>Rapporteur</i>
<b>Christian MAZARS</b>	<i>Directeur de Recherche Université Paul Sabatier -CNRS- Toulouse- France</i>	<i>Rapporteur</i>
<b>Rajaa Ait MHAND</b>	<i>Professeur Habilité Université Hassan II Mohammedia, Maroc</i>	<i>Examineur</i>
<b>François BOUTEAU</b>	<i>Maître de Conférences Université Paris-Diderot 7, Paris, France</i>	<i>Directeur de thèse</i>
<b>Moulay Mustapha ENNAJI</b>	<i>Professeur d'Enseignement Supérieur Université Hassan II Mohammedia, Maroc</i>	<i>Directeur de thèse</i>

<b>Etablissements :</b>	<b>Faculté des Sciences et Technique Mohammedia Faculté des Sciences d'Orsay</b>
<b>CEDocs :</b>	<b>Sciences, Techniques, Ingénierie et Développement Durable Sciences du Végétal ED 145</b>
<b>Noms des laboratoires :</b>	<b>Laboratoire de Virologie et Hygiène &amp; Microbiologie (LVHM) Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes (LEM)</b>

...

# PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

## A. Articles Scientifiques (08)

### A.1. Articles Scientifiques Internationaux (04)

**Kettani-Halabi, M.\***, Terta, M.\*, Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'Hand, R.A., El-Maarouf-Bouteau, H., Val, F., Ennaji, M.M., and Bouteau, F. 2010. *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*. Molecular Plant-Microbe Interactions **23**:139-143. (\* Co-auteur)

Baz M., Tran D., **Kettani-Halabi M.**, Samri S.E., Jamjari A., Biligui B., Meimoun P., El-Maarouf-Bouteau H., Garmier M., Saindrenan P., Ennaji M.M., Barakate M., and Bouteau F. 2012. *Calcium and ROS mediated defense responses in BY2 tobacco cells by non-pathogenic Streptomyces sp.* Journal of Applied Microbiology **112**:782-792.

**Kettani-Halabi M.**, Tran D, Dauphin A, Errakhi R, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Early common and differential responses of Arabidopsis thaliana cells to lipopolysaccharides from pathogenic and non-pathogenic bacteria* (Submitted in Journal of Experimental Botany).

**Kettani-Halabi M.**, Terta M, Amdan M, Elfahim M, Bouteau F, Ennaji MM. *Sequence analysis of a pmrA gene as a tool to identify Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum in relation to potato diseases* (Submitted in BMC Microbiology).

### A.2 Articles Scientifiques Nationaux (04)

**Kettani-Halabi M.**, Amdan M, Terta M, Tran D, Yekkour A, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. 2012 *Les lipopolysaccharides, biostimulants pour la protection de la pomme de terre contre Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. Moroccan journal of plant protection **4**:131-140.

Terta M., Spirada U., Faouzi A., Melloul, M., El Fafime El., Amdan M., **Kettani-Halabi M.**, Ait M'hand R., Achbani El., Barakate M., Bouteau F., Ennaji MM. 2012. *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis associée à la pourriture molle de la pomme de terre : une première mise en évidence au Maroc*. Moroccan journal of plant protection **4**:107-118.

Amdan M., Ennaji MM., Terta M., **Kettani-Halabi M.**, Faqihi H., Barakat M., Ait Mhand R. *L'agressivité de Pectobacterium carotovorum, agent responsable de la pourriture molle de la pomme de terre*. Moroccan journal of plant protection **4**:97-106.

Amdan M., Terta M., **Kettani-Halabi M.**, Achbani El., Ennaji MM. 2012. *Pathogénicité de Pectobacterium sp. Agent responsable de la pourriture molle de la pomme de terre*. Dans Ennemis de la culture de pomme de terre au Maroc. Edition Dr El Hassan Achbani. Septembre 2011 pp 39-49.



### **B. Communications Orales (04)**

**Kettani-Halabi M**, Tran D, Amdan M, Terta M, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Implication des Lipopolysaccharides (LPS) dans la stimulation de la défense chez Arabidopsis thaliana*. 4ème Journée Scientifique Nationale de l'Environnement et de la Santé « Impact de l'Environnement sur la Santé Public » le 02 Juin 2011 à la FSTM, Maroc ;

**Kettani-Halabi M**, Tran D, Terta M, Amdan M, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Rôle des Lipopolysaccharides (LPS) dans l'induction des mécanismes de défense chez Arabidopsis thaliana, nouvelle approche pour lutter contre le Pectobacterium spp.* Congrès International « La Recherche, la Biotechnologie et le Consommateur au service de l'Environnement et de l'Industrie Agroalimentaire" le 19 et 20 Mai 2011 à la Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc ;

**Kettani-Halabi M**, Terta M, Ibenyassine K, Tran D, Meimoun P, M'hand RA, El-Maarouf-Bouteau H, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Arabidopsis thaliana cells: a model to evaluate the virulence of Pectobacterium carotovorum*. Congrès International MICROBIOD-2009 « Biotechnologie microbienne au service du développement » tenu le 02-05 Novembre 2009 à Marrakech – Maroc ;

Ennaji MM, Ait M Hand R, Achabni E, Terta M, **Kettani-Halabi M**, Baz M, El karkouri A, El Hassouni M, Maaroufi H, Val F, Bouteau F, Barakate M. *Caractérisation de la biodiversité de la bactérie macérogène Erwinia sp. au Maroc*. Congrès International MICROBIOD-2009 « Biotechnologie microbienne au service du développement » tenu le 02-05 Novembre 2009 à Marrakech – Maroc.

### **C. Communications Affichées (07)**

**Kettani-Halabi M**, Tran D, Terta M, M'hand RA, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Use of Arabidopsis thaliana cells to analyse the pathogenicity of Pectobacterium carotovorum*. Congrès de la Société Française de Phytopathologie 2012 du 05 et 8 juin 2012, Paris – France.

Yekkour A, Tran D, **Kettani-Halabi M**, Mathieu F, Briand J, Errakhi R, Lebrihi A, Sabaou N, Bouteau F. effect of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol on *Nicotiana tabacum* cells: signaling events leading to PCD. Congrès de la Société Française de Phytopathologie 2012 du 05 et 8 juin 2012, Paris – France.

**Kettani-Halabi M**, Tran D, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Cell signaling induced by bacterial LPS in Arabidopsis thaliana*. The First International Meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms: from basic science to clinical application. October 31-November 4, 2011 Marrakesh, Morocco.

**Kettani-Halabi M**, Terta M, Amdan M, M'hand RA, Barakate M, Achbani E, Val F, Bouteau F, Ennaji MM. *Virulence et Diversité Génétique du Pouvoir Pathogène des Souches de Pectobacterium carotovorum Isolées des Pommes de Terre Marocaines*. Congrès International « La Recherche, la Biotechnologie et le Consommateur au service de l'Environnement et de l'Industrie Agroalimentaire » du 19 et 20 mai 2011 de la Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc.

**Kettani-Halabi M**, Tran D, Terta M, Amdan M, Val F, Ennaji MM, Bouteau F. *Mechanisms involved in cell signaling in response to various LPS in Arabidopsis thaliana*. Congrès International « La Recherche, la Biotechnologie et le Consommateur au service de

l'Environnement et de l'Industrie Agroalimentaire » du 19 et 20 mai 2011 de la Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc.

**Kettani-Halabi M**, Terta M, Amdan M, M'hand RA, Barakate M, Achbani E, Val F, Bouteau F, Ennaji MM. *Pectobacterium carotovorum* de la Pomme de Terre Marocaine: Nouvelle Nomenclature pour *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Symptomatologie, Sources et Facteurs de Contamination. 1<sup>er</sup> Journée de l'Eau sous le thème « Eau et Santé » tenu le 27 Mai 2010 Casablanca, Hôtel Riad Salam, Maroc ;

Amdan M, Terta M, **Kettani-halabi M**, Ait M'hand R, Ennaji MM. *Biodiversité de la bactérie Erwinia sp. responsable de la pourriture molle de la pomme de terre au Maroc*. 1<sup>er</sup> Journée de l'Eau sous le thème « Eau et Santé » tenu le 27 Mai 2010 Casablanca, Hôtel Riad Salam, Maroc.

#### **D. Publication à Gene Bank (NCBI) de 30 séquences du gène *pmrA* du *Pectobacterium***

**Kettani-Halabi M**, Terta M, Amdan M, Melloul M, El Alaoui A, El Fahime E.M, Bouteau F and Ennaji M.M. 2012. *Sequence analysis of the gene encoding polymyxin resistance (PmrA) from different strains of Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. PopSet: 383549958

[Display Settings:](#) ☒ PopSet

[Send to:](#) ☒

#### **Pectobacterium carotovorum response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds.**

PopSet: 383549958

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Go to:](#) ☒

#### **Study Details**

**Sequence analysis of the gene encoding polymyxin resistance (PmrA) from different strains of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.**

Kettani Halabi,M., Terta,M., Amdan,M., Melloul,M., El Alaoui,A., El Fahime,E.M., Bouteau,F.O. and Ennaji,M.M.

[Go to:](#) ☒

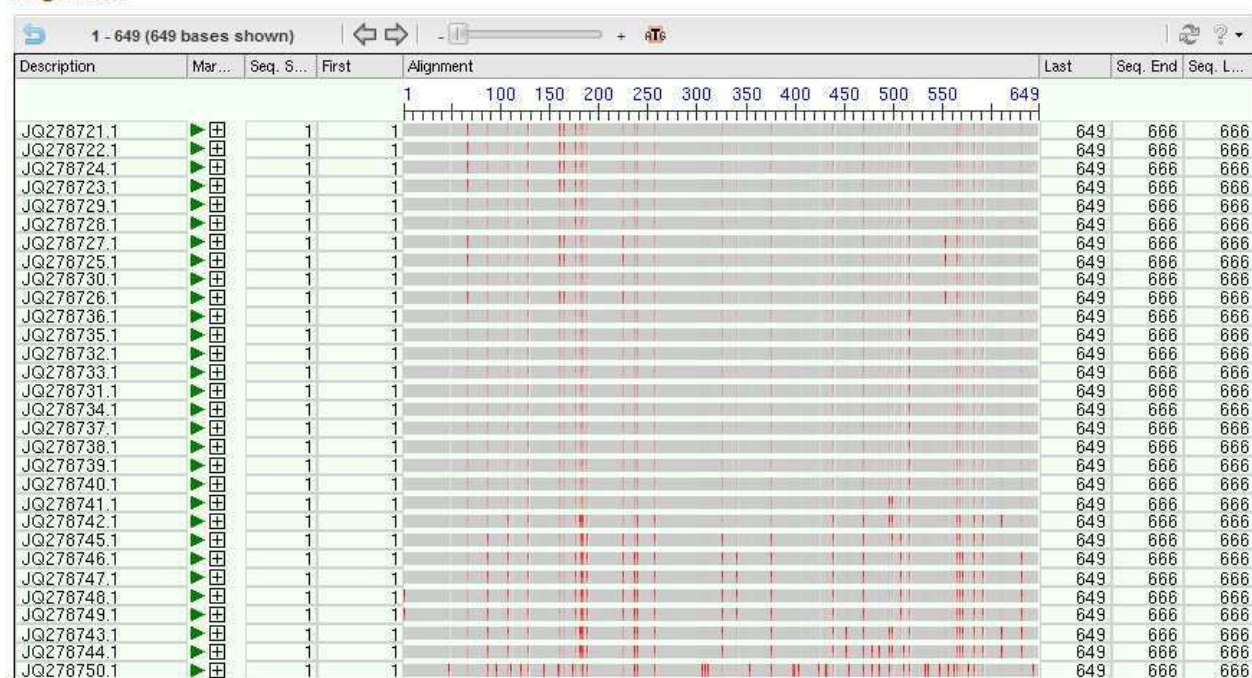
#### **Sequences in this data set**

<a href="#">JQ278750.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense strain P206C3 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278749.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P116C2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278748.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P126S11 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278747.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P211C3 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278746.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P116C3* response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278745.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P116C4* response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278744.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P603AH2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278743.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P507C4 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278742.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P507K12 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278741.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P603AH3* response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278740.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P109C3 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278739.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P507CH1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278738.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P606SK5 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278737.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P111C4 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278736.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P606Sd2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278735.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P211C2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278734.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P109C1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278733.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P109C2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278732.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P606Sd3 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278731.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P606SK2* response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278730.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P211C1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds

<a href="#">JQ278729.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P507BM2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278728.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P116SK1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278727.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P106F1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278726.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P111C2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278725.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P106F2 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278724.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P111C1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278723.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P111C3 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278722.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P211C4 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds
<a href="#">JQ278721.1</a>	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain P603AH1 response regulator PmrA (pmrA) gene, partial cds

Go to: ☐

## Alignment



">

# FORMATIONS DOCTORALES

## Volume totale des Formations Transversales : 252 heures

**NB : Justificatifs voir livret du doctorant pages 15, 16, 17,56 et attestations jointes.**

**Tableau 1 : Formations Transversales → Volume totale (252 heures)**

Dates	Noms de Formations	Nb d'heures	lieu	Intervenants
16 Avril 2012	Emploi des docteurs et nouveaux métiers	06 heures	France	ADOC Talent Management
15 Mars et 05 Avril 2012	Apprendre à Enseigner : Apprentissage de l'écoute et d'un langage factuel - Analyse des émotions professionnelles	12 heures	France	Alain Finkel et Christine Legarlantézec
04 Avril 2012	La publication scientifique aujourd'hui	06 heures	France	Annaïg Mahé
08 Mars 2012	Découverte de la création d'entreprise	04 heures	France	Eric Langrognet
16, 18, 19 et 20 Mai 2011	Environnement et Management de l'Entreprise	09 heures	Maroc	Jamal Youssef
28 Mai 2011	Le Neuro-management « une approche innovante issue des neurosciences »	2 heures	Maroc	Saida Toufik
25, 27 Mai et 01 Juin 2011	Coaching Académique	18 heures	Maroc	Saida Toufik
Mai 2011	Cours d'Anglais	25 heures	Maroc	Saïda Messaouri
Du 07 au 13 Décembre 2009	7ème édition des Doctoriales du Maroc «DM'2009»	150 heures	Maroc	INMA <sup>b</sup>
Novembre 2006	Certificat Informatique et Internet (niveau 1),	20 heures	Maroc	FSTM

a : Centre de Vulgarisation de la Connaissance.

b : Incubateur Universitaire de Marrakech

## Volume totale des Formations Spécifiques 199 heures

**NB : Justificatifs voir livret du doctorant pages 25 à 26 et attestations jointes**

**Tableau 2 : Formations Spécifiques → Volume totale formation Spécifiques (199 heures)**

Dates	Noms de Formations	Nb d'heures	lieu	Intervenants
04, 05, 11, 12, 19, 26 Mars 2010	Système HACCP	26 heures	Maroc	Faqih Houssa
09, 15, 16, 23, 30 Avril 2010	Accréditation des Laboratoires	21 heures	Maroc	Faqih Houssa
Du 01 Mars 2010 au 10 Avril 2010	Maitrise statistique des Procédés	50 heures	Maroc	Koussaimi Abdellah
Du 06 Mars 2010 au 29 Mai 2010	Système de management de la qualité ISO 9001v2008	12 heures	Maroc	Bahaj Abdelkarim
Du 10 Mai 2010 au 21 Juin 2010	Système de Management de la santé et de la sécurité au travail (OHSAS 18001v2007)	40 heures	Maroc	Koussaimi Abdellah
Du 19 au 21 Juillet, 2010	Cours de bio-informatique: Genome Sequence to Personalized Medicine: Bioinformatics & Pharmaceutical Sciences	21 heures	Maroc	Mohammed Bourdi
Du 25 au 27 Octobre, 2011	Cours de bio-informatique FSTM	17 heures	Maroc	Mary E. Mangan, et Warren C.
07 Septembre 2011	Introduction au nouveau web of Knowledge	1 heure	France	Ghislain Onestas
07 Septembre 2011	Présentation de l'outil Endnote Web	1 heure	France	Ghislain Onestas
08 Septembre 2011	Présentation de Researcher ID	1 heure	France	Ghislain Onestas

08 Septembre 2011	Présentation du Journal Citation Report	1 heure	France	Ghislain Onestas
08 Septembre 2011	Recherche d'informations scientifiques via Google (trucs et astuces)	1 heure	France	Yvette Lafosse
09 Septembre 2011	Comprendre la syndication de contenu et les flux RSS	1 heure	France	Yvette Lafosse
12 Septembre 2011	Personnaliser son interface via Netvibes	1 heure	France	Yvette Lafosse
15 Septembre 2011	Partager du contenu grâce aux wikis	1 heure	France	Yvette Lafosse
16 Septembre 2011	Créer son moteur de recherche personnalisé via Google	1 heure	France	Yvette Lafosse
19 Septembre 2011	Les réseaux sociaux scientifiques et le microblogging	1 heure	France	Yvette Lafosse
20 Septembre 2011	Les sites de partage	1 heure	France	Yvette Lafosse
26 Septembre 2011	Présentation découverte de BiblioCNRS	1 heure	France	Yvette Lafosse

**Volume total des encadrements pédagogiques: 08 heures**

*NB : Justificatifs voir livret du doctorant page 35.*

**Tableau 3 : Encadrements pédagogiques → Volume totale (08 heures)**

Dates	Noms de Formations	Nb d'heures	lieu	Filière
20 Octobre 2010	Travaux pratiques d'électrophysiologie (Principe et Techniques)	08 heures (2X 4heures)	France	Bio-photonique Licence Pro

**Volume total des encadrements de stages : 285 jours**

*NB : Justificatifs voir livret du doctorant pages 42 à 45.*

**Tableau 4 : Encadrements de stages → Volume totale (285 jours)**

Dates	Noms de Formations	Nb de jours	lieu	Filière
Du 01 au 15 Mai 2010	Effets cellulaires des LPS sur modèle <i>Nicotiana tabacum</i>	15 jours	France	L2 Sciences de la vie
Du 01 au 30 Avril 2011	Impact de PAMPs sur les cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	30 jours	France	M1 AgroParis Tech
Du 01 Janvier au 30 Mars 2012	Effets de la DON sur les réponses rapides des cellules de tabac.	90 jours	France	Doctorant de l'Ecole Normale d'Alger
Du 10 Octobre au 10 Novembre 2010	Rôle des Actinomycètes dans la protection des cellules d' <i>Arabidopsis</i> contre le <i>Pectobacterium</i>	30 jours	France	Doctorant de l'Université Cadi Ayyad
Du 01 Avril au 30 Mai 2012	Détection de ROS intracellulaire suite à un stress abiotique	60 jours	France	M1 AgroParis Tech
Du 01 au 30 Octobre 2012	Identification phénotypiques, des souches de <i>Pectobacterium</i> liées aux pourritures molles de pomme de terre	30 jours	Maroc	Doctorante de l'Université Hassan II – Mohammedia
Du 01 au 30 Novembre 2012	Isolement et confirmation moléculaire des souches de <i>Pectobacterium</i> marocaines	30 jours	Maroc	Doctorante de l'Université Hassan II – Mohammedia

# DÉDICACE

*À mes chers parents, à ma sœur adorée, à mes frères et à toute ma  
famille à qui j'exprime tout mon amour*



# REMERCIEMENTS

*Tout d'abord je voudrais remercier très chaleureusement, Madame le Professeur Rahma BOURQIA, ex Présidente de l'Université Hassan II Mohammedia – Casablanca (UH2MC), Monsieur le Professeur Saâd CHARIF D'OUAZZANE Président de l'UH2MC et Monsieur le Professeur Guy COUARAZE, Président de l'Université Paris-Sud 11, pour m'avoir accordé l'autorisation d'entamer une thèse en cotutelle dans leur université. De même, je voudrais remercier Monsieur le Professeur Mohamed RAFIQ, Doyen de la Faculté des Sciences et Technique Mohammedia (FSTM) et Monsieur Philippe MASSON, Doyen de la Faculté des Sciences à Orsay pour avoir accepté ma candidature de Doctorant au sein de leur établissement. Je remercie également Monsieur le Professeur Mimoun ZAZOUI, Directeur du Centre d'Etudes Doctorales Sciences, Techniques, Ingénierie et Développement Durable et Madame le Professeur Jacky SHYKOFF, Directrice de l'école doctorale Science du Végétale ED 145 pour le bon suivi de ma formation au sein de leur école doctorale.*

*Je remercie profondément toute en exprimant ma très vive gratitude à l'égard de Monsieur le Professeur Moulay Mustapha ENNAJI et le Professeur François BOUTEAU, mes deux directeurs de thèse, pour m'avoir accordé leur confiance et m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Cher Professeur MM. Ennaji, j'ai particulièrement apprécié votre lucidité et votre encadrement, toujours juste, toujours disponible, pour un encadrement au quotidien, malgré vos obligations au laboratoire LVHM et à la FSTM. Merci d'avoir supporté avec beaucoup de patience et de compréhension mon caractère obstiné, merci pour votre humanité et vos encouragements précieux tout au long de ma thèse. Cher directeur F. Bouteau, vous êtes bien plus que mon « co- » directeur de thèse. Je n'oublierai jamais votre premier accueil à l'aéroport d'Orly avec une pancarte à la main où l'on peut lire mon nom. Je n'oublierai non plus, les « réunions de travail » de chaque mercredi à Jussieu - Paris 7 ou encore les diverses discussions scientifiques et culturels des pauses déjeuners. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de cette thèse, sur les plans scientifiques et humains. Merci de m'avoir laissé la liberté d'apprendre et de travailler de manière autonome, tout en étant présent et disponibles. Merci pour votre patience et vos remarques constructives lors de la correction du manuscrit. Mes chers encadrants, Pr Ennaji et Bouteau Je ne pense pas que je pourrai vous rendre un jour tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Je souhaite remercier Monsieur le Professeur Michel DRON, directeur de l'institut de biologie des plantes (IBP) pour avoir accepté de présider le jury de thèse et pour m'avoir accueilli ainsi que toute l'équipe Paris 7 au sein de son institut. Je remercie également l'ensemble des autres membres du jury Monsieur le Directeur Christian MAZARS, Monsieur le professeur Mouncef BENCHEKROUN, Madame le professeur Rajaa Ait MHAND pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.*

*Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Madame le Professeur Alia DELLAGI, Madame le Professeur Florence VAL, Monsieur le Professeur Yves HENRY et Monsieur le Professeur Patrick SAINDRENAN, pour avoir pris le temps de suivre mon travail et m'aider à l'orienter dans les bonnes directions*

*Un travail de recherche ne se fait jamais seul. Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du LVHM qui ont su instaurer une ambiance amicale au cours de ces années de thèse. En particulier Meriem Terta, pour son soutien et ses coups de main et Mohamed Amdan pour son sens de l'humour, son aide et son humanité. Je lui souhaite ainsi qu'à Hind Fakih une grande réussite dans leurs travaux de thèse.*

*Mes remerciements vont également à tous les membres du LEM pour tous les bons souvenirs que j'emporte. Daniel, merci pour ton soutien inconditionnel, ton aide inestimable et ton écoute. Merci pour tes "Schedules" et tes bons plans de manips et merci également pour m'avoir fait découvrir Paris. Merci à Joël pour ses discussions stimulantes et à Bernadette pour ses coups de main et sa gentillesse. Merci à Amine pour sa générosité, son sens de l'écoute et tous les dimanches passés ensemble. "Grazie" à Emanuela pour sa joie de vivre qu'elle communique et son altruisme. Je lui souhaite également une grande réussite dans ses travaux de thèse. Petite pensée à Ibtiham et à tous les stagiaires M1 et M2 qui sont passés dans l'équipe.*

*Je suis également très reconnaissant à Monsieur le Professeur Elmostafa El fahime, chef de service des Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique, CNRST de m'avoir grand ouvert les portes de sa Plateforme Génomique Fonctionnelle et de m'avoir fait part de ses remarques pertinentes. Je remercie toute son équipe pour sa gentillesse et plus spécialement Aziz et Marwan pour leurs aides tout au long de mon stage.*

*Une pensée particulière à mes amis les thésards : Mustapha Mouallif (pour sa fraternité son soutien et sa modestie ; Merci pour m'avoir fait visiter Liège et Maastricht), Khalid Moumad, Zakaria Orfi, Zakaria Hadha, Faysal Ounzar, Warda Baha, Zineb Qmichou, Amal El Amrani, kawtar Hajjami et toutes les autres personnes qui ont contribué directement ou non à la réussite de ce travail de thèse. Enfin, une pensée spéciale à Noâma Berrada. Merci d'être restée près de moi tout ce temps, de m'avoir écoutée et de m'avoir transmis toute ta force dans les moments difficiles.*

*Un grand merci à ma famille : Maman, Papa, Omar, Anas, Salma, Sanae et lamiae pour m'avoir soutenue pendant ma thèse. Je vous aime plus que tout et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'apportez chaque jour. Je suis arrivée là grâce à vous.*

*Je voudrais également, remercier l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) et le Ministère des Affaires Etrangères et Européennes conjointement avec le Ministère Marocain de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, dans le cadre du Programme de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD 07-07) par leur financement qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse.*

*J'aimerais au finale exprimer ma gratitude à l'égard des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de thèse.*



## ملخص

تعتبر بكتيريا البكتوبكتريوم (*Pectobacterium*) من بين العوامل الممرضة الأكثر أهمية اقتصاديا في مجال زراعة البطاطس حيث لوحظ ارتفاع نسبة الأمراض الناتجة عن هاته البكتيريا خلال السنوات الأخيرة. في هذه الأطروحة تم التطرق إلى دراسة بعض جوانب التنوع المتعلقة بالبكتيريا *Pectobacterium* spp و التي تتجلى فيما يلي : (١) التنوع الوراثي المتعلق بالعوامل التي تضبط القدرة الممرضة للبكتيرية (٢) التنوع المتعلق بمدى ضرر البكتيريا *Pectobacterium* بالنسبة للخلية المضيفة (٣) دور و تنوع المؤثرات الناتجة عن جزيئات Lipopolysaccharides (LPS) المكونة لسطح البكتيرية. تشير هذه الدراسة أيضا إلى الدور المهم الذي يمكن أن تقوم به جزيئات LPS في المكافحة البيولوجية ل *Pectobacterium* spp. تهدف مختلف التجارب الخلوية و الجزيئية المستعملة في هذه الأطروحة إلى تحديد نوعية البكتيرية و فهم طرق التواصل الخلوي. النتائج المحصل عليها مكنتنا من التوصل إلى أن تحليل نيكليوتيدات المورثة *PmrA*، التي تساهم في التحكم في القدرة الممرضة للبكتيريا *Pectobacterium*، يمكن اعتباره طريقة جزيئية لتحديد نوع *Pcc* و وسيلة فعالة لتقييم التنوع الوراثي المتواجد بين أفراد النوع الواحد. من جهة أخرى أوضحنا بأنه يمكن استعمال خلايا *Arabidopsis thaliana* كنموذج لتقييم مدى حدة و ضرر *Pectobacterium carotovorum* و تم الحصول على هذه الأخيرة من خلال دراسة حركية ثلاث بارامترات مرتبطة بالقدرة الممرضة لهاته البكتيريا : نشاط بيكتات لياز (Pectate-lyases) التي تعتبر المحدد الأساسي لمدى حدة *Pcc*، تسرب الإليكروليتات الدالة على ظاهرة الموت الخلوي، و الموت الخلوي نفسه لخلايا *Arabidopsis thaliana*. و أوضحنا أيضا أن تأثير جزيئات LPS المكونة لسطح البكتيرية على خلايا *Arabidopsis thaliana* جد متنوع. و بالتالي تمكنا من إبراز ثلاث أنواع مختلفة من الاستجابات لجزيئات LPS: الاستجابات المتماثلة، الاستجابات المشتركة و الاستجابات النوعية. هذه النتائج تشير إلى أن مختلف طرق التواصل الخلوي يمكنها أن تساهم في الاستجابة لجزيئات LPS عند *Arabidopsis thaliana* و تبين أيضا الدور الأساسي الذي يمكن أن تقوم به هذه الجزيئات في المكافحة البيولوجية ضد بكتيريا ال *Pectobacterium*

كلمات مفتاح: *Pectobacterium*، البطاطس، *Arabidopsis thaliana*، LPS، الموت الخلوي، ROS.

# RÉSUMÉ

Les bactéries *Pectobacterium* sont classées parmi les agents pathogènes les plus importants économiquement pour la culture de la pomme de terre. Au cours des dernières années, une augmentation des maladies dues à ces bactéries a pu être observée. Le but de ce travail de thèse était d'analyser certains aspects de la diversité liés aux *Pectobacterium* sp à savoir : (i) la diversité génétique liée aux régulateurs du pouvoir pathogène de la bactérie (ii) la diversité de virulence et d'agressivité des souches de *Pectobacterium* vis-à-vis de leurs hôtes et (iii) le rôle et la diversité des effets induits par le lipopolysaccharides (LPS), composants de la surface bactérienne de bactéries phytopathogène ou non phytopathogène. Ce travail de thèse souligne également le rôle potentiel que pourrait jouer ces molécules LPS dans le biocontrôle des *Pectobacterium* sp. Différentes expérimentations cellulaires et moléculaires allant de l'identification de la bactérie à la compréhension des voies de signalisation ont été utilisées. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer, en premier lieu que, le séquençage du gène *pmrA*, gène connu pour être impliqué dans la régulation du pouvoir pathogène des *Pectobacterium*, est un outil moléculaire complémentaire d'identification de sous espèces de *Pcc* et pourrait être aussi un moyen efficace d'évaluation de la diversité génétique intra-spécifique. Dans un second temps, nous avons montré que les cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* pourraient être un modèle végétal d'évaluation de l'agressivité des *Pectobacterium*. Ceci a été obtenu par quantification des cinétiques de trois paramètres associés à la pathogénie de ces bactéries à savoir : l'activité des pectate-lyases, déterminant majeur du pouvoir pathogène des *Pcc*, la fuite des électrolytes, considérée comme un marqueur précoce de la mort cellulaire, et la mort cellulaire des cultures elle-même. Enfin nous avons également montré que les effets induits par les LPS chez les cellules d'*Arabidopsis thaliana* sont dépendant du type bactérien. En effet Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence trois types de réponses différentes aux LPS en fonction de leur origine: les réponses identiques (régulation des flux d'ions), des réponses communes mais présentant des intensités et de cinétiques différentes (production de ROS, induction de gènes de défense) et des réponses spécifiques (induction d'une PCD, alcalinisation du milieu). Ces résultats indiquent que différentes voies de signalisation pourraient être activées chez *Arabidopsis thaliana*. Ils nous ont permis également de mieux comprendre l'implication des LPS dans le biocontrôle contre les *Pectobacterium* sp.

**Mots clés :** *Pectobacterium*, Pomme de terre, *Arabidopsis thaliana*, LPS, Signalisation cellulaire, Biocontrôle.

# ABSTRACT

*Pectobacterium* are classified among the most economically important pathogens of culture of potato. Recently, an increase in diseases caused by these bacteria was observed. The work presented in this thesis has allowed highlighting some aspects on diversity associated with *Pectobacterium* sp namely: (i) genetic diversity related with the pathogenicity of the bacterium (ii) the diversity in virulence and aggressiveness of *Pectobacterium* strains on its hosts and (iii) the role and the diversity of effects induced by lipopolysaccharide (LPS), bacterial surface components of phytopathogenic and non- phytopathogenic bacteria. First, we have demonstrated that sequencing the *pmrA* gene, known to be involved in the regulation of pathogenicity of *Pectobacterium*, is an additional molecular tool for identification of *Pectobacterium* subspecies. Moreover, *pmrA* gene could be an effective tool for evaluation of genetic diversity within species. In a second time, we have showed that cell cultures of *Arabidopsis thaliana*, could be used as an alternative system to evaluate rapidly and efficiently the virulence of different *Pectobacterium* strains. This was achieved by quantification of different parameters associated to the pathogenesis of these bacteria namely, the activity of pectate lyases, major determinant of the pathogenicity of *Pcc*, the electrolyte leakage, considered an early marker of cell death and the cell death itself. Finally, our data further suggest the effects induced by LPS from different origin on *Arabidopsis thaliana* cells, could be different. Indeed, three different types of responses to LPS have been shown: the identical responses (regulation of ion flux), the common responses but having different intensities and kinetics (ROS production, induction defense genes) and specific responses (induction of PCD, alkalization of the medium). These results indicate that different signaling pathways could be involved in *Arabidopsis thaliana* in response to LPS and allowed us to highlight the potential role of LPS in the biocontrol of *Pectobacterium* sp.

**Keywords:** *Pectobacterium*, Potato, *Arabidopsis thaliana*, LPS, Cell signaling, Biocontrol.

# TABLE DES MATIÈRES

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES .....	III
FORMATIONS DOCTORALES .....	VII
DEDICACE .....	IX
REMERCIEMENTS .....	X
ملخص .....	XII
RESUME .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
TABLE DES MATIERES .....	15
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	17
LISTE DES TABLEAUX .....	18
LISTE DES FIGURES .....	19
LISTE DES ANNEXES .....	22
PROBLÉMATIQUE .....	23
HYPOTHÈSE DE TRAVAIL .....	24
AVANT-PROPOS .....	25
INTRODUCTION GENERALE .....	27
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....	30
CHAPITRE 1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE .....	32
1. POMMES DE TERRE ET AGENTS PHYTOPATHOGENES : CAS DE <i>PECTOBACTERIUM</i> SP.....	32
1.1 Quelques chiffres sur la production de pomme de terre .....	32
1.1.1. A l'échelle marocaine.....	32
1.1.2. A l'échelle internationale.....	33
1.2. Facteurs influençant la production de la pomme de terre .....	34
1.2.1. Les facteurs abiotiques .....	34
1.2.2. Les facteurs biotiques .....	34
1.3. Les maladies de la pomme de terre liées aux <i>Pectobacterium</i> sp. ....	35
1.3.1. La pourriture molle des tubercules:.....	35
1.3.2. La jambe noire .....	38
1.4. Origine de la nomenclature et taxonomie des <i>Pectobacterium</i> sp.....	39
1.5. Agents bactériens responsables de la pourriture molle de pomme de terre.....	40
1.6. Isolement et identification des <i>Pectobacterium</i> sp.....	41
1.6.1. Tests phénotypiques et biochimiques .....	41
1.6.2. Tests moléculaires .....	44
1.7. Pouvoir pathogène des bactéries pectinolytiques .....	46
1.7.1. Principaux facteurs de virulence .....	46
1.7.1.1. Système de sécrétion type II et dégradation de la paroi végétale .....	46
1.7.1.2. Système de sécrétion type I et sécrétion des protéases .....	51
1.7.2. Autres facteurs affectant la pathogénie .....	51
1.7.2.1. Système de sécrétion de type III et effecteurs.....	51

1.7.2.2. Mobilité.....	52
1.7.2.3. Sidérophores.....	53
1.7.2.4. Lipopolysaccharides.....	54
1.8. Régulation des gènes de virulences chez <i>Pectobacterium sp.</i> .....	56
1.8.1. Systèmes de régulation à deux composantes (TCS).....	56
1.8.2. Quorum sensing (QS).....	59
2. STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LES <i>PECTOBACTERIUM SP.</i> .....	61
2.1. La lutte physique.....	61
2.2. Lutte chimique.....	61
2.3. Lutte génétique et transgénèse.....	62
2.4. Lutte biologique.....	62
3. VOIES DE SIGNALISATION DES REPONSES DE DEFENSE.....	67
3.1. La résistance basale PTI et reconnaissance de l'agent pathogène.....	68
3.2. La résistance ETI et reconnaissance de l'agent pathogène.....	71
3.3. Transduction du signal et signalisation précoce.....	72
3.3.1. Modifications des flux ioniques.....	73
3.3.2. Modifications de pH extracellulaire.....	74
3.3.3. Rôle du Calcium dans la signalisation cellulaire.....	74
3.3.4. Phosphorylation et déphosphorylation de protéines.....	76
3.3.5. Production d'espèces réactives de l'oxygène ou "burst" oxydatif.....	78
3.3.6. Production du monoxyde d'azote (NO).....	81
3.3.7. Induction des gènes de défense.....	82
3.3.8. La réaction hypersensible.....	85
<b>CHAPITRE 2. DIVERSITE GENETIQUE DU <i>PECTOBACTERIUM SP.</i> : ANALYSE DE SEQUENCES DU GENE <i>PMRA</i>.....</b>	<b>90</b>
1. PRESENTATION.....	90
2. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	91
3. ARTICLE 2.1.....	91
<b>CHAPITRE 3. EVALUATION DE LA DIVERSITE D'AGRESSIVITE DE DIFFERENTES SOUCHES DE <i>PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM</i>.....</b>	<b>110</b>
1. PRESENTATION.....	110
2. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	111
3. ARTICLE 3.1.....	111
<b>CHAPITRE 4. DIVERSITE DE REPONSES CELLULAIRES AUX LPS CHEZ DES CELLULES <i>D'ARABIDOPSIS THALIANA</i> EN SUSPENSION.....</b>	<b>120</b>
1. PRESENTATION.....	120
2. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	121
3. ARTICLE 4.1.....	121
4. ARTICLE 4.2.....	122
<b>CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>168</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>172</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>195</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>218</b>

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ABA</b>	ABscissic Acid	<b>Pcc</b>	Pectobacterium carotovorum carotovorum
<b>AHL</b>	n-Acyl Homoserine Lactone	<b>PCD</b>	Programmed cell death
<b>AMPc</b>	Adénosine MonoPhosphate cyclique	<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate	<b>PGA</b>	Polygalacturonate
<b>Avr</b>	Produit des gènes d'avirulence	<b>PGPR</b>	plant growth-promoting rhizobacteria
<b>BAK1</b>	brassinosteroid receptor1-associated kinase 1	<b>PR</b>	Pathogenesis-Related protein
<b>BET</b>	Bromure d'ETHidium	<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub></b>	Calcium libre cytosolique	<b>PTI</b>	PAMP-triggered immunity
<b>CAT</b>	CATalase	<b>RLP</b>	receptor-like protein
<b>CNGC</b>	Cyclic Nucleotide-Gated Channel	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular pattern	<b>SA</b>	Salicylic Acid
<b>DO</b>	Densité Optique	<b>SAR</b>	résistance systémique acquise
<b>DPI</b>	DiPhénylIodonium	<b>SOD</b>	SuperOxyde Dismutase
<b>EFR</b>	Elongation factor-Tu receptor	<b>T1SS</b>	Type 1 Secretion System
<b>ET</b>	Ethylène	<b>T2SS</b>	Type 2 Secretion System
<b>ETI</b>	Effector-triggered immunity	<b>T3SS</b>	Type Three Secretion System
<b>FLS2</b>	Flagellin sensing 2	<b>TEA</b>	TetraEthylAmmonium
<b>GR</b>	Glutathion Réductase	<b>TIR</b>	domain toll/récepteur b l'interleukine 1
<b>GSH</b>	Gluthation	<b>v/v</b>	Volume par volume
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène		
<b>HR</b>	Hypersensitive response		
<b>ISR</b>	Résistance systémique induite		
<b>JA</b>	Jasmonic Acid		
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide		
<b>LRR</b>	région riche en leucine		
<b>MAMP</b>	Microbe-associated molecular pattern		
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase		
<b>MAPKK</b>	MAP kinase kinase		
<b>MAPKKK</b>	MAP kinase kinase kinase		
<b>MeJA</b>	Méthyl-jasmonate		
<b>NADP</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate		
<b>NB-LRR</b>	Récepteur type nucleotide binding		
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote		
<b>NOS</b>	NO Synthase		
<b>OG</b>	Oligogalacturonate		
<b>Pa</b>	Pectobacterium atrosepticum		
<b>PAL</b>	Phenylalanine ammonia-lyase		
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern		
<b>pb</b>	Paire de base		

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre 1

<b>Tableau 1.</b>	Résumé des tests phénotypiques et biochimiques pour distinguer les <i>Pectobacterium</i> sp.....	<b>42</b>
<b>Tableau 2.</b>	Résumé des principales amorces utilisées dans l'identification des <i>Pectobacterium</i> associés aux pourritures molles de pomme de terre.....	<b>45</b>
<b>Tableau 3.</b>	Enzymes pectinolytiques secrétées par le T2SS des <i>Pectobacterium</i> sp.....	<b>49</b>
<b>Tableau 4.</b>	Principaux espèces réactives de l'oxygène produites par la cellule végétale.....	<b>78</b>
<b>Tableau 5.</b>	Différents types de protéines PR.....	<b>83</b>

## Chapitre 2

### Article 2.1.

<b>Tableau 1.</b>	Strains used in this study.....	<b>99</b>
<b>Supplementary Table 1.</b>	Phenotypic characteristics of the strains of <i>Pectobacterium</i> isolated from potato in comparison with standard isolate.....	<b>108</b>

## Chapitre 3

### Article 3.1.

<b>Supplementary Table 1.</b>	Biochemical, physiological, and molecular characteristics of the <i>Pectobacterium carotovorum</i> strains.....	<b>118</b>
-------------------------------	---	------------

## Chapitre 4

### Article 4.1.

<b>Tableau 1.</b>	Primers used for semi-quantitative RT-PCR analyses.....	<b>130</b>
-------------------	---	------------

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre 1

<b>Figure 1.</b>	Production de pomme de terre dans certains pays de l'Afrique du nord (1999 – 2010).....	<b>33</b>
<b>Figure 2.</b>	Cycle de développement de la pourriture molle.....	<b>36</b>
<b>Figure 3.</b>	Aspect de quelques symptômes causés par <i>Pectobacterium</i> sp.....	<b>37</b>
<b>Figure 4.</b>	Dendrogramme phylogénétique des séquences du gène 16S rRNA de sous espèce <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> .....	<b>39</b>
<b>Figure 5.</b>	Système de sécrétion type II de <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure 6.</b>	Représentation schématique du T3SS d'une bactérie phytopathogène.....	<b>52</b>
<b>Figure 7.</b>	Schéma structural des LPS.....	<b>54</b>
<b>Figure 8.</b>	Régulation globale de l'expression des gènes de virulence de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	<b>56</b>
<b>Figure 9.</b>	Schéma simplifié de la régulation de la virulence par le système PmrA/PmrB.....	<b>58</b>
<b>Figure 10.</b>	Principes de l'immunité des plantes.....	<b>70</b>
<b>Figure 11.</b>	Origine et devenir métabolique des ROS produits par les différents compartiments de la cellule végétale.....	<b>79</b>
<b>Figure 12.</b>	Suppression de la réponse hypersensible par un prétraitement avec le LPS dans les interactions plantes-bactéries.....	<b>88</b>

## Chapitre 2

### Article 2.1.

<b>Figure 1.</b>	Amplification of a specific 666 bp band in 7 strains generated using <i>pmrA</i> F0145 and E2477 primers.....	<b>100</b>
<b>Figure 2.</b>	Phylogenetic tree based on a comparison of <i>pmrA</i> sequences for <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	<b>101</b>
<b>Figure 3.</b>	Nucleic acid sequence alignment of <i>pmrA</i> gene among various strains of <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	<b>102</b>
<b>Figure 4.</b>	Compressed subtree sequenced data for <i>pmrA</i> gene of 5 <i>Enterobacteriaceae</i> based upon Neighbor-Joining method.....	<b>104</b>



## Chapitre 3

<b>Figure 1.</b>	Test de pathogénie des souches de <i>Pectobacterium carotovorum</i> à différentes concentrations sur tubercules de pomme de terre.....	<b>110</b>
<b>Article 3.1.</b>		
<b>Figure 1.</b>	<b>A.</b> Time course of <i>Arabidopsis thaliana</i> cell death after inoculation with <i>Pectobacterium carotovorum</i> 132C at rates of either $10^8$ or $10^4$ CFU.mL <sup>-1</sup> . <b>B.</b> Time course of the growth of strain 132C ( $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> ) in Gamborg medium without plant cells. <b>C.</b> Time course of pectinolytic activities in the culture medium after inoculation of <i>A. thaliana</i> cells with strain 132C at either $10^8$ or $10^4$ CFU.mL <sup>-1</sup> . <b>D.</b> Time course of electrolyte leakage increase in the culture medium during coculture of <i>A. thaliana</i> cell after inoculation with strain 132C at $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> . <b>E.</b> Light micrographs of <i>A. thaliana</i> cells stained with Evans blue before (control) and 3 and 12 h after inoculation with <i>P. carotovorum</i> at $10^4$ CFU.mL <sup>-1</sup> .....	<b>114</b>
<b>Figure 2.</b>	Time course of <i>Arabidopsis thaliana</i> cell death during coculture after inoculation with <i>Pectobacterium carotovorum</i> strains 1351, 1339, 1349 and CFPB5980 at rates of either <b>A.</b> $10^8$ or <b>B.</b> $10^4$ CFU.mL <sup>-1</sup> .....	<b>114</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>A.</b> Time course of pectinolytic activities measured in the culture medium during coculture of <i>Arabidopsis thaliana</i> cell after inoculation with various <i>Pectobacterium carotovorum</i> strains at the rate of $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> . <b>B.</b> Time course of electrolyte leakage increase in the culture medium during coculture of <i>A. thaliana</i> cell after inoculation with various <i>P. carotovorum</i> strains at $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> .....	<b>115</b>
<b>Figure 4.</b>	Mean values of soft-rot diameter caused by the different <i>Pectobacterium carotovorum</i> strains at $10^2$ , $10^4$ , and $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> .....	<b>115</b>

## Chapitre 4

## Article 4.1.

<b>Figure 1.</b>	Effect of LPS from various bacteria on cell viability of <i>A. thaliana</i> cultured cells.....	<b>131</b>
<b>Figure 2.</b>	Production of reactive oxygen species (ROS) by <i>A. thaliana</i> cultured cells in response to LPS from various bacteria.....	<b>133</b>
<b>Figure 3.</b>	Variations in the pH medium of <i>A. thaliana</i> cultured cells elicited by $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS <sub>Pcc</sub> or LPS <sub>P.aeruginosa</sub> .....	<b>134</b>
<b>Figure 4.</b>	Effect of LPS on defense-related gene expression in <i>A. thaliana</i> cells.....	<b>136</b>
<b>Figure 5.</b>	Effect of 14h of pretreatment with $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS <sub>Pcc</sub> and LPS <sub>P.aeruginosa</sub> on cell death induced by CFBP 5890 on <i>A. thaliana</i> cells after 24h.....	<b>137</b>
<b>Supplemental figure 1.</b>	Recordings of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ of <i>Arabidopsis</i> cells expressing the apoaequorin gene upon addition of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS <sub>Pcc</sub> or LPS <sub>P.aeruginosa</sub> .....	<b>148</b>
<b>Supplemental figure 2.</b>	Whole cell ion currents measured under control conditions and 9 min after adding $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS <sub>Pcc</sub> or LPS <sub>P.aeruginosa</sub> .....	<b>149</b>

**Article 4.2.**

<b>Figure 1.</b>	<b>A.</b> Augmentation du poids de tissu macéré de tubercule de pomme de terre induite par $10^8$ CFU.mL <sup>-1</sup> de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> au cours du temps. Encart : aspect de la macération du tissu végétatif sur un demi-tubercule 24h après l'inoculation de <i>Pcc</i> . <b>B.</b> Effet des prétraitements par les LPS <sub>Pcc</sub> et LPS <sub>P.aeruginosa</sub> sur le poids de tissu macéré par le <i>Pcc</i> .....	<b>155</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>A.</b> Photographie de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en suspension avant infection (à gauche) et 12h après l'infection par <i>Pcc</i> (à droite). <b>B.</b> Effet des LPS et de la durée de prétraitement sur la mort cellulaire des cellules d' <i>A. thaliana</i> induite par <i>Pcc</i> après 24h de co-culture. Un taux basal de 15% de cellules mortes a été enregistré sur les cultures sans aucun traitement.....	<b>157</b>

# LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1.</b>	Protocole expérimental de l'identification moléculaire des souches de <i>Pectobacterium</i> .....	<b>196</b>
<b>Annexe 2.</b>	Méthodologie expérimentale de détection de niveau d'agressivité des souches de <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	<b>200</b>
<b>Annexe 3.</b>	Principe du Voltage clamp dans l'étude des variations des canaux ioniques...	<b>202</b>
<b>Annexe 4.</b>	Principe de détection du calcium cytosolique par la technologie aequorine.....	<b>204</b>
<b>Annexe 5.</b>	Induction du calcium cytosolique par les LPS de bactéries non phytopathogène chez <i>Nicotiana tabacum</i> (BY2).....	<b>205</b>
<b>Annexe 6.</b>	Article joint: Calcium and ROS-mediated defence responses in BY2 tobacco cells by nonpathogenic <i>Streptomyces</i> sp.....	<b>206</b>

# PROBLÉMATIQUE

Les entérobactéries du genre *Pectobacterium* spp ont un spectre d'hôte très large puisqu'ils induisent des maladies chez des espèces variées d'angiospermes. Ces pathogènes infectent notamment des plantes d'intérêt agronomique telle que les pommes de terre (*Solanum tuberosum*). Les pertes se situent aussi bien en champ, au cours du transport, que lors du stockage en post-récolte. L'impact économique ne peut être évalué puisqu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et des répercussions qui peuvent subsister pendant plusieurs années.

Dans ce contexte et pour parvenir à développer des moyens de luttés contre ces bactéries il est important d'améliorer nos connaissances notamment concernant la biodiversité de ces bactéries. Les caractères microbiologiques et biochimiques d'identification phénotypique des souches de *Pectobacterium* spp. ont été largement étudié. Cependant, le nombre de ces caractères est faible et ne reflète qu'un nombre réduit d'information, d'où l'intérêt d'associer l'identification phénotypique à l'identification moléculaire. Ainsi, les marqueurs moléculaires phylogénétiques liés aux systèmes de régulation du pouvoir pathogène, qui sont un outil moléculaire efficace d'identification spécifique de l'espèce bactérienne, demeurent inconnus chez *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*). Leur association aux études de biodiversité moléculaire n'est encore pas explorée. De plus, peu de suivis épidémiologiques de *Pectobacterium* n'ont été effectués en raison d'absence de véritable caractérisation phénotypique et moléculaire à l'échelle de la sous-espèce.

L'évaluation de la diversité d'agressivité et de virulence des souches de *Pectobacterium carotovorum* et en particulier les souches isolées au Maroc est aussi très peu étudiée. Finalement aucun traitement biologique de lutte efficace, permettant de prévenir ou de réduire les dégâts causés par les *Pectobacterium* n'est disponible actuellement.

# HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

L'étude de la diversité d'un agent bactérien responsable de dégâts économiques importants tel que le *Pectobacterium* est un sujet complexe, pour lequel, plusieurs interrogations peuvent être suscitées : Le *Pectobacterium* n'est-il pas un groupe de bactéries homogène facile à identifier et à caractériser par les outils standards d'identification phénotypique utilisés en routine dans les laboratoires de bactériologie ou nécessite il l'intervention d'outils moléculaires spécifiques ? Si l'utilisation d'outils moléculaires spécifique d'identification et d'évaluation de la diversité génétique est nécessaire, ne faudrait-il pas explorer d'autres marqueurs moléculaires complémentaires pour une meilleure maîtrise du matériel génétique de la bactérie ? D'autres interrogations portant sur la diversité du pouvoir pathogène et la diversité de virulence de la bactérie peuvent être soulevées. De ce fait, ne serait-il pas nécessaire de développer un nouveau modèle végétal capable d'évaluer d'une manière plus simple et rapide cette diversité de virulence ? Ne serait-il pas intéressant de déterminer le lien entre la virulence exprimée et les facteurs du pouvoir pathogène ? Par ailleurs, comprendre la diversité des effets cellulaires et moléculaires induits par certaines molécules du pouvoir pathogène ne serait-il pas un élément clé dans l'établissement d'un moyen de lutte biologique efficace contre le *Pectobacterium* spp. ?

# AVANT-PROPOS

**Nom :** KETTANI HALABI

**Prénom :** Mohamed

**Intitulé du travail :** Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes.

**Directeurs de la thèse :** ENNAJI Moulay Mustapha (Professeur d'Enseignement Supérieur, Université Hassan II Mohammedia – Casablanca, Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, Maroc) et BOUTEAU François (Maître de conférences, Université Paris Diderot – Paris 7, France).

**Laboratoires où les travaux de cette thèse ont été réalisés :**

- Laboratoire de Virologie et Hygiène & Microbiologie (LVHM), Faculté des Sciences et Techniques – Mohammedia (FSTM), Maroc.
- Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique (UATRS), Plateforme Biologie moléculaire et Génomique Fonctionnelle, Centre National de Recherche Scientifique et Technique (CNRST) – Rabat, Maroc.
- Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes (LEM), Institut de Biologie des Plantes (IBP) – Orsay, France.
- Plateforme d'Imagerie cellulaire Pitié-Salpêtrière, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France

**Cadre de coopération-soutien financier :**

- Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse ont été soutenus par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), et le Ministère des Affaires Etrangères et Européennes conjointement avec le Ministère Marocain de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, dans le cadre du Programme de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD 07-07).

---

# *Introduction générale*

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les bactéries du genre *Pectobacterium* sont classées parmi les agents pathogènes les plus importants économiquement pour la culture de pommes de terre (Hélia, 2008). La pourriture molle qu'elles induisent est une des plus importantes maladies bactériennes de la pomme de terre à l'échelle mondiale (Chibane, 1999). Au cours des dernières années, une augmentation des maladies dues à ces bactéries a pu être observée. Les tubercules peuvent être infectés au champ avant la récolte ou pendant le stockage. Les dommages peuvent être considérables, car elle évolue très rapidement. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et des répercussions qui peuvent subsister pendant plusieurs années.

Les caractères phénotypiques et génétiques des souches de *Pectobacterium* ont déjà fait l'objet de différentes études. En revanche, les marqueurs moléculaires phylogénétiques liés aux systèmes de régulation du pouvoir pathogène, spécifiques aux *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (*Pcc*) sont moins connus. Leur association aux études de biodiversité moléculaire n'est encore pas explorée. Par ailleurs, si beaucoup de connaissances ont été réunies sur les déterminants du pouvoir pathogène et la diversité génétique de ces espèces (Gardan et al., 2003; Samson et al., 2005), en sélectionnant des marqueurs génétiques corrélés à leur pouvoir pathogène, très peu d'études se sont intéressées directement à évaluer la diversité de virulence et d'agressivité de ces bactéries.

Il reste aussi de nombreuses interrogations concernant les stratégies potentielles de lutte contre le *Pectobacterium*. Dans le contexte actuel du développement durable la connaissance approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénie et des mécanismes de défense de la plante amenant à la résistance des plantes hôtes, pourrait permettre d'envisager de nouvelles méthodes de lutte biologique efficaces contre le pathogène (Zhang and Zhou, 2010 ; Tsuda and Katagiri, 2010 ; Erbs and Newman, 2012).

L'objectif de ce travail dans la continuité des travaux de recherche menés par l'équipe du Laboratoire de Virologie et Hygiène & Microbiologie (LVHM) de Mohammedia, est de participer à l'étude de la diversité de la bactérie et de ces effets sur la plante. Ainsi, nous avons



étudié un marqueur phylogénétique complémentaire, le gène *pmrA*, connu pour être impliqué dans la régulation du pouvoir pathogène de la bactérie.

Nous avons proposé également un modèle végétale d'évaluation de la diversité de virulence et d'agressivité existantes entre les souches de *Pectobacterium carotovorum*, par l'étude de la cinétique de certains processus physiologiques des cellules d'*Arabidopsis thaliana* infectées par différentes souches de *Pectobacterium*. Les résultats de cette étude nous ont amenés à explorer, sur le plan fondamental, le dialogue moléculaire qui s'installe entre les cellules d'*Arabidopsis* et un composé majeur de la paroi des *Pectobacterium*, le lipopolysaccharide, composé connu chez d'autres bactéries pour induire des réponses de défense chez la plante.

La compréhension des réseaux de signalisation induits par un stimulateur des défenses naturelles d'origine bactérien et la caractérisation des acteurs moléculaires associés à ces réseaux sont des domaines de recherche actifs, notamment au sein de l'équipe du Laboratoire d'électrophysiologie des membranes (LEM) de Paris en collaboration avec l'UMR1349 de l'Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes (IGEPP) de Rennes.

---

## *Objectifs du travail de thèse*

# OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

## Objectifs généraux

Participer à l'étude et la compréhension de la biodiversité de *Pectobacterium* spp.

## Objectifs spécifiques

Dans ce contexte, cette thèse cible les deux principaux objectifs spécifiques suivant :

- 1- Contribuer à (i) l'étude de la diversité génétique des souches de *Pectobacterium* échantillonnées au Maroc au travers de l'utilisation d'un gène régulateur de la virulence comme marqueur moléculaire de diversité dans les études phylogéniques et (ii) l'étude de la diversité d'agressivité des souches de *Pectobacterium* sur cellules d'*Arabidopsis thaliana* et tubercules de pomme de terre.
- 2- Contribuer à l'étude de la diversité du dialogue cellulaire et moléculaire qui s'établit entre les bactéries gram négatif et le végétal en s'intéressant aux effets d'un MAMP, le LPS (dans la mesure où de nombreuses études ont déjà ciblé les effets des déterminants majeurs du pouvoir pathogène des *Pcc*, à savoir les PCWDEs) et de son rôle potentiel dans le biocontrôle des souches de *Pectobacterium*.

# **CHAPITRE 1**

## *Revue bibliographique*

## Chapitre 1. Contexte bibliographique

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une plante vivace, passant la mauvaise saison sous forme de tubercule, ou tige souterraine. Elle est originaire de l'Amérique du Sud et appartient à la famille des Solanacées. La partie consommée est le tubercule. Ce dernier, présente une haute valeur nutritive en tant que source des glucides complexes, riche en fibres et minéraux. Il est également apprécié pour son cycle de production court (6 mois).

### 1. Pommes de terre et agents phytopathogènes : cas de *Pectobacterium* sp.

#### 1.1 Quelques chiffres sur la production de pomme de terre

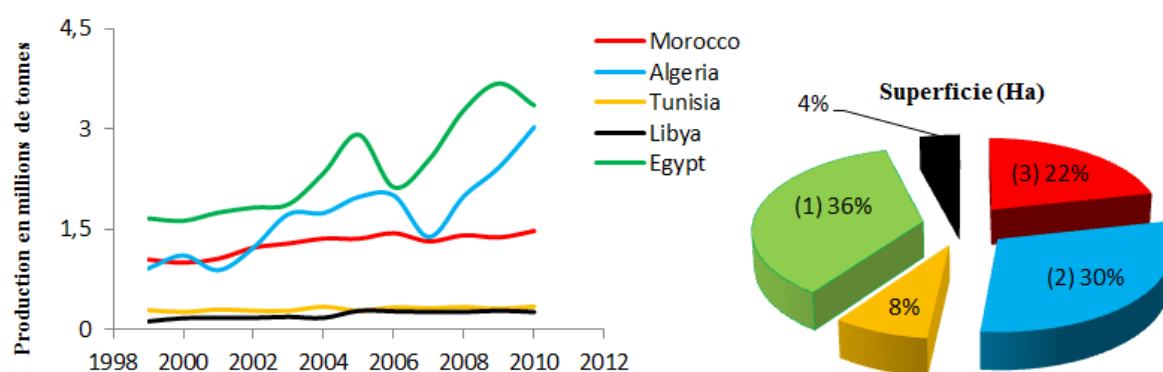
##### 1.1.1. A l'échelle marocaine

Au Maroc, depuis son introduction au XIX<sup>ème</sup> siècle, la pomme de terre a connu un essor considérable que cela soit dans la superficie cultivée, ou dans les habitudes alimentaires. Elle est cultivable durant presque toute l'année et pratiquement dans toutes les régions du Maroc (Chibane, 1999). La superficie occupée par les cultures maraîchères varie chaque année entre 180 et 200 000 hectares, dont environ 62 000 ha/an emblavés en pomme de terre, soit plus de 25% de la superficie maraîchère totale. La production a également augmenté considérablement, passant de quelque 150 000 tonnes en 1961 à un volume record de 1,6 million de tonnes en 2010 correspondant à 28 tonnes/ha (FAOSTAT, 2012). De ce fait, la pomme de terre est classée première culture maraîchère de saison des points de vue superficie et production (Rousselle et al., 1996), deuxième exportation après la tomate (culture de primeur) et troisième culture vivrières après la betterave à sucre et le blé. Sa production est concentrée le long de la côte atlantique, au nord et au sud de Casablanca, où le climat méditerranéen est propice à sa culture. Sa consommation est de 42 kg/an et par habitant. Les principales variétés utilisées au Maroc sont : Nicola (à chair blanche) ; Spunta (à chair blanche) et Désirée (à chair rouge) (Rousselle et al., 1996). La production de pomme de terre revêt une importance capitale pour l'agriculture marocaine. Sa demande ne cesse d'augmenter annuellement. Elle joue un rôle important dans l'économie marocaine (Sedgui et al., 2000).

- Situation dans les pays voisins du Maroc

En Algérie, comme le montre la figure 1, la filière pomme de terre continue d'enregistrer des performances encourageantes grâce à la mise en synergie des différents acteurs de cette filière,

l'introduction des techniques de production et de conservation et beaucoup plus au professionnalisme des agriculteurs. Les statistiques indiquent que la production a atteint 3,2 MT en 2010 contre 2,67 MT en 2009 et 2,2 millions de tonnes en 2008 (FAOSTAT, 2012). La filière prévoit d'augmenter progressivement le rendement à l'hectare qui est actuellement de 25 tonnes pour atteindre, en définitive, un niveau de production de 4 millions de tonnes/an dès 2014.



**Figure 1.** Production de pomme de terre dans certains pays de l'Afrique du nord (1999 – 2010), d'après FAOSTAT (2012).

Quant à la production de l'Égypte, elle a enregistré une baisse de 9% en 2010, mais reste tout de même la plus élevée dans cette zone méditerranéenne. La plus faible production est enregistrée par la Tunisie et la Libye qui ne dépasse pas une production de 0,3 MT (figure 1).

### 1.1.2. A l'échelle internationale

La pomme de terre est la 4<sup>ème</sup> culture mondiale après le blé, le riz et le maïs. La Chine est le premier pays producteur mondial et produit autant que l'Union Européenne à 27 États (environ 20% des 330 millions de tonnes produites dans le monde). Quatre pays dépassent 40 tonnes/ha, à savoir le Pays-Bas, les USA, la France et l'Allemagne, tandis que le rendement moyen en Chine, Inde et Russie reste inférieur à 20 tonnes/ha. La France est le seul pays à dépasser les 2 millions de tonne/an pour une superficie d'environ 165 000 ha se positionnant comme premier exportateur mondial de pommes de terre (FAOSTAT, 2012). Ces statistiques expliquent les raisons pour lesquelles l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a déclaré 2008 "Année internationale de la pomme de terre (IYP)". En dépit de son importance stratégique dans la sécurité alimentaire et la réduction de la pauvreté, la culture de la pomme de terre demeure sujette à de nombreuses maladies conduisant à des pertes économiques considérables en agriculture.

## 1.2. Facteurs influençant la production de la pomme de terre

A l'instar des autres cultures, la culture de pomme de terre peut subir les effets de nombreux facteurs abiotiques (climatiques, édaphiques...) ou biotiques tel que les ravageurs et les microorganismes (champignons, oomycètes, virus et bactéries) conduisant à des pertes économiques importantes (Rensink et al., 2005).

### 1.2.1. Les facteurs abiotiques

Ce sont des facteurs non infectieux et non transmissibles d'une plante altérée à une plante saine. Les principaux sont les sécheresses prolongées, les tempêtes de grêle, de fortes précipitations et/ou des pluies irrégulières réparties inégalement, l'apparition précoce ou au contraire tardive du gel et de la neige dans les cultures en altitude (Bettina Stäubli, 2008). S'ajoutent à ces facteurs climatiques, la structure et la nature du sol, les concentrations en éléments minéraux (calcium, fer ...) et la pollution qui peut affecter l'air, l'eau et le sol.

### 1.2.2. Les facteurs biotiques

Ce sont les ravageurs et les maladies parasitaires. **Les ravageurs** regroupent l'ensemble des espèces animales qui causent des dégâts aux cultures au champ, au cours du transport ou du stockage. Les plus importants sont les insectes phytophages et les nématodes, par exemple *Globodera pallida*, nématode à kyste de la pomme de terre (Blok et al., 2006). Les dégâts occasionnés par les ravageurs animaux peuvent porter sur les parties aériennes de la plante de pomme de terre. Outre les dégâts directs qu'ils occasionnent en prélevant leur nourriture sur les plantes, certains ravageurs sont des vecteurs d'agents de maladies (virus, mycoplasmes, bactéries et champignons).

**Les maladies parasitaires** sont infectieuses et contagieuses. Les agents pathogènes responsables de ces maladies peuvent être à type d'exemple : des champignons, (*Alternaria solani* – Alternariose ; *Fusarium* spp. – Fusariose ...) ; des oomycètes (*Phytophthora infestans* – Mildiou de la pomme de terre) ; des virus (Potato Virus Y ; PVY et Potato Virus X ; PVX – Mosaïque de la pomme de terre ...) et des bactéries (*Clavibacter michiganensis* – Pourriture annulaire ; *Ralstonia solanacearum* – Pourriture brune et *Pectobacterium* sp. – Pourriture molle de pomme de terre ...).

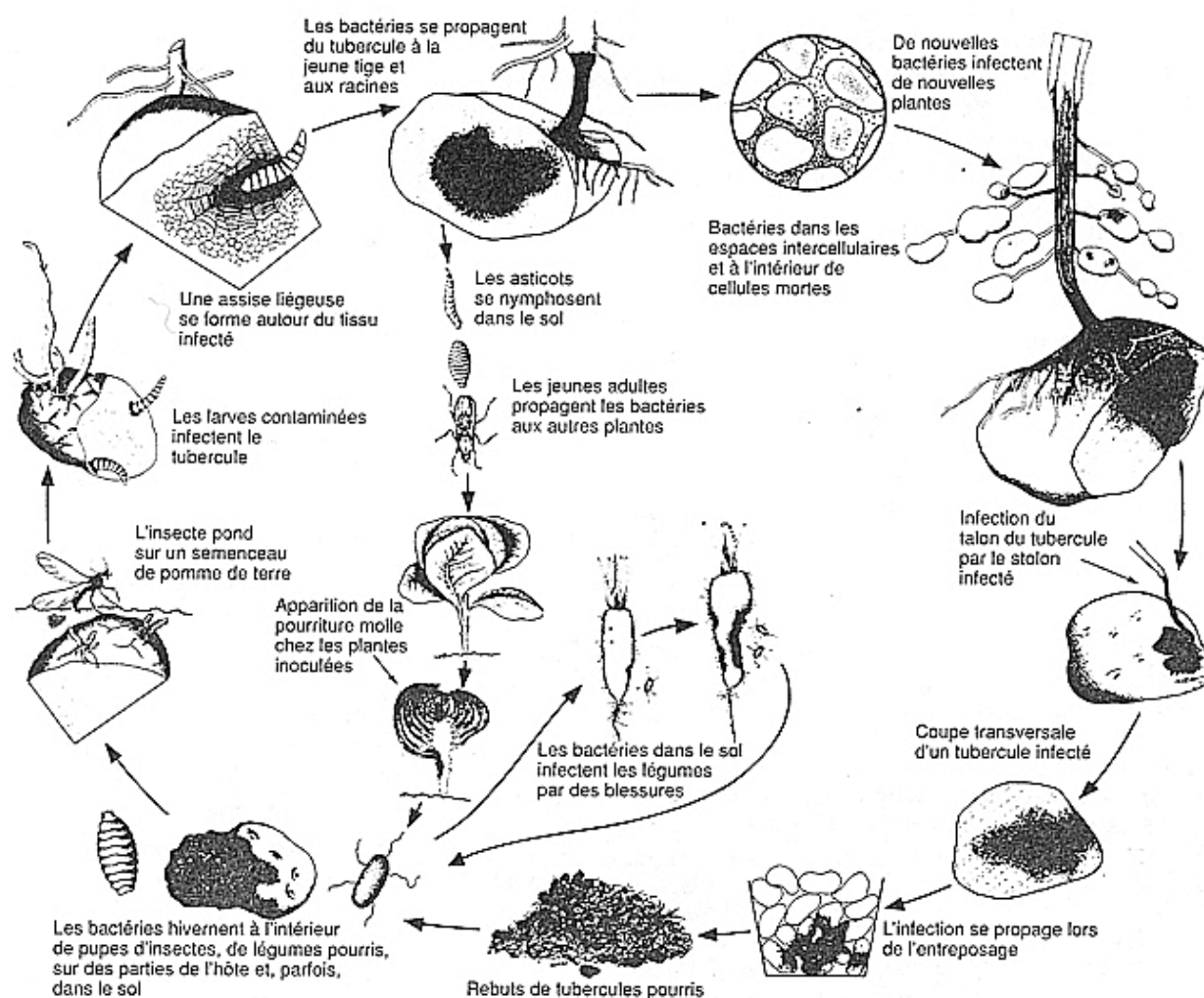
### 1.3. Les maladies de la pomme de terre liées aux *Pectobacterium* sp.

Au cours des dernières années, une augmentation de maladies dues aux bactéries *Pectobacterium* a été constatée. Ce groupe de bactéries est classé parmi les agents pathogènes les plus importants économiquement pour la culture de pommes de terre (Hélia, 2008). Lors d'infections précoces des pousses par le *Pectobacterium* sp., des déficiences de peuplement apparaissent au champ. Avec une infection plus tardive, différents symptômes peuvent être distingués à savoir: la pourriture molle des tubercules et la jambe noire. Les symptômes peuvent se manifester différemment selon la variété, le temps, la période d'infection et l'agent pathogène (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003a).

#### 1.3.1. La pourriture molle des tubercules:

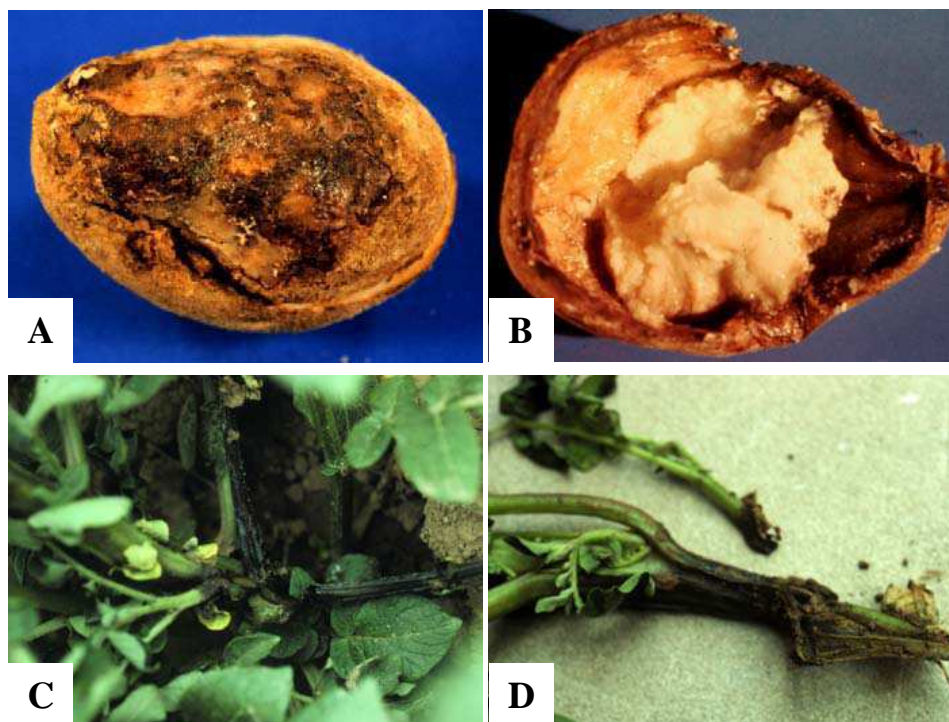
La pourriture molle est la plus importante maladie bactérienne de la pomme de terre à l'échelle mondiale (De Boer, 1994). Les tubercules peuvent être infectés au champ avant la récolte ou pendant le stockage (Corcuff et al., 2011). Les semences et les sols infectés sont les principales sources d'inoculum, et la propagation de l'infection au champ est facilitée par les eaux d'irrigation et de pluie. La dissémination en entrepôt est de son côté assurée par le suintement de tubercules pourris et par les insectes (figure 2)(Yaganza, 2005).





**Figure 2.** Cycle de développement de la pourriture molle, d'après Howard et al. (1994)

*Pectobacterium carotovorum carotovorum* (Pcc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) et *Dickeya dadantii* sont les trois espèces à l'origine de la pourriture molle des tubercules (Pérombelon, 2002; Toth and Birch, 2005). Selon le mode de contamination, la pourriture débute au bout du stolon ou au niveau des lenticelles. Les parties atteintes montrent d'abord une décoloration légèrement brune. Un halo brun, qui plus tard se creuse, s'accompagne d'une transformation de la chair en une pourriture molle typique de la maladie (figure 3A et B). Cette pourriture incolore qui en sort devient rapidement rougeâtre à brun foncé au contact de l'air. Elle dégage une odeur de moisi et de renfermé due à l'acide butyrique.



**Figure 3.** Aspect de quelques symptômes causés par *Pectobacterium* sp., d'après Christ et al. (1998).

(A) Pourriture molle de l'extérieur de tubercule, (B) Pourriture molle de l'intérieur de tubercule, (C et D) Jambe noire à la base des tiges.

**Situation du *Pectobacterium* sp. au Maroc :** Le problème de la pourriture molle des tubercules a été signalé pour la première fois en 1977 dans les lots de pomme de terre destinés à l'exportation (Abdane, 1982). En 2001, le Maroc a connu une première apparition d'une pourriture molle de la racine des betteraves sucrières qui a réduit fortement le taux d'extraction du sucre (Snaiki et al., 2005). Les prospections effectuées sur des cultures de la pomme de terre atteintes de maladies bactériennes dans les régions de Meknès, El Hajeb et Larache ont permis d'isoler 101 souches pathogènes de *Pectobacterium* sp. responsables des pourritures molles et de la jambe noire (INRA-Maroc, 2007). L'activité pectinolytique et les tests phénotypiques effectués sur soixante et une souches pathogènes ont permis l'identification de 33 souches du *Pcc*, 25 souches de *Pa* et 3 souches ayant le profil du *Dickeya* sp. (INRA-Maroc, 2007). Des études récentes ont confirmées que l'agent le plus souvent associé aux pourritures molles, humides observées sur tubercules de pomme de terre est le *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (ex *Erwinia carotovora carotovora*) (Gardan et al., 2003; Terta et al., 2010).

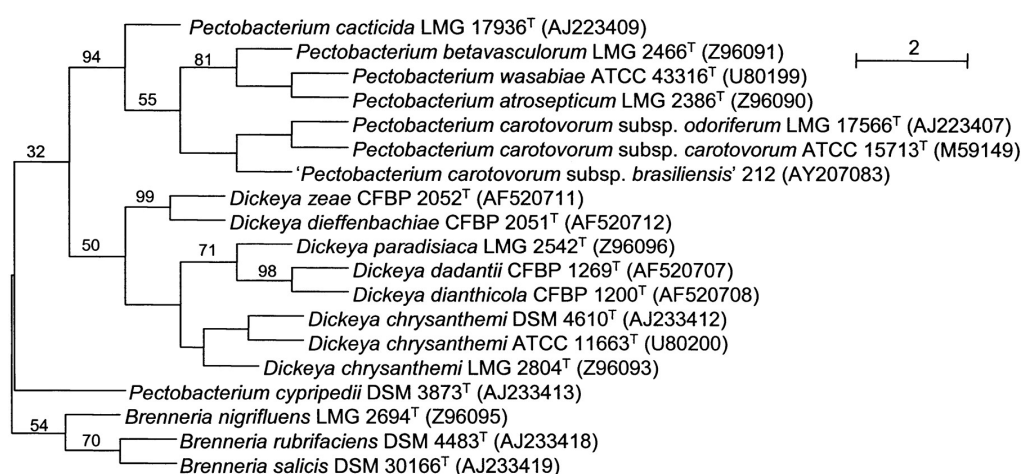
---

1.3.2. La jambe noire

Cette maladie est caractérisée par une lésion noire, souvent visqueuses, se développant à la base des tiges (figure 3 C et D). Ces dernières se laissent facilement arracher, car leurs racines sont détruites. Généralement la maladie débute à partir du tubercule de semence. Les feuilles s'enroulent, jaunissent et finalement flétrissent. Les tubercules pourrissent à partir du stolon. La jambe noire peut se manifester en partie déjà au printemps sur de jeunes plantes, cependant l'infection devient principalement visible seulement en début d'été (juin/juillet). Elle est très répandue surtout en conditions climatiques humides. En conditions sèches et froides, l'attaque est moins violente et le noircissement peut se limiter à la moelle. Cette maladie est principalement due à *Pectobacterium atrosepticum* (ex *Erwinia carotovora atroseptica*) (Toth et al., 2003b; Czajkowski et al., 2011).

#### 1.4. Origine de la nomenclature et taxonomie des *Pectobacterium* sp.

Le genre *Pectobacterium* (ex *Erwinia carotovorum*) est un groupe de bactéries pectinolytiques isolé pour la première fois en 1901 par Jones sous le nom de *Bacillus carotovorus* d'une pourriture humide de carotte (Skerman et al., 1980). En 1920, en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, Winslow classa ces bactéries pectinolytiques dans le genre *Erwinia*. Ce genre comprend deux groupes d'espèces morphologiquement similaires mais présentant de nettes différences d'expression du pouvoir pathogène et de caractéristiques biochimiques. Il renferme d'une part l'espèce type *Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien et d'autre part les *Erwinia* pectinolytiques responsables de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre (Perombelon and Kelman, 1980; Toth and Birch, 2005). En 1945, Waldee proposa la création du genre *Pectobacterium* pour classer les *Erwinia* pectinolytiques dans un groupe séparé des autres *Erwinia*. Cependant, cette nomenclature a longtemps été controversé par la communauté de recherche d'*Erwinia* (Gardan et al., 2003; Toth et al., 2003a). En 1969, Dye proposa de diviser le genre *Erwinia* en quatre groupes (*Amylovora*, *Herbicola*, *Carotovora* et *Erwinia* atypique) et en 1998, Hauben réussit à dissocier sur la base de la comparaison des séquences d'ADN 16S et des structures secondaires des ARN correspondants les *Pectobacterium* en quatre genres : *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Brenneria* et *Pantoea* (Hauben et al., 1998). Des récentes études de taxonomie ont abouti à de nouvelles modifications de la nomenclature des espèces d'*Erwinia* (Gardan et al., 2003; Samson et al., 2005). L'analyse d'une collection de souches de *Pectobacterium* sp. associant des techniques moléculaires, phénotypiques et sérologiques ainsi que les analyses phylogénétiques ont conduit les auteurs à distinguer clairement trois genres différents : *Pectobacterium* spp, *Dickeya* spp et *Brenneria* spp (figure 4).



**Figure 4.** Dendrogramme phylogénétique des séquences du gène 16S rRNA de sous espèce *Pectobacterium* et *Dickeya*, d'après Samson et al. (2005).

### 1.5. Agents bactériens responsables de la pourriture molle de pomme de terre

Trois espèces d'ex *Erwinia* peuvent causer la maladie de la pourriture molle " soft-rot en anglais" : *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* et *Dickeya dadantii*. Ces bactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et forment un groupe d'agents pathogènes des *Solanum tuberosum*. Ce sont des bacilles Gram négatif, en bâtonnets droits de 0,5 à 1,0 µm par 1,0 à 3,0 µm, anaérobies facultatives, mobiles grâce à des flagelles pérित्रiches, isolées par paires et parfois en chaînes courtes, oxydase négative et catalase positive (Dickey et al., 1984). Elles sont capable de réduire les nitrates, fermenter le glucose et la produire de l'acide à partir de certains hydrates de carbone (méliobiose, D-arabitol ou tréhalose). Leur température optimale de croissance se situe entre 27°C et 35°C selon les espèces (Perombelon and Kelman, 1980).

Les *Pectobacterium* produisent de grandes quantités d'enzymes pectinolytiques qui en synergie avec d'autres enzymes provoquent la dégradation des tissus végétaux, à des degrés d'agressivité variables (Whitehead et al., 2001). Ces bactéries peuvent se trouver à un état de latence même à une concentration de 10<sup>6</sup> UFC, elles se situent dans l'espace intercellulaire dans le tissu vasculaire (xylème) au niveau des blessures et au niveau des lenticelles. Cette dormance est souvent liée à la non disponibilité des nutriments et/ou la déficience en eau libre pour la croissance de la bactérie (Pérombelon, 2002). En cas d'excès d'eau en terre ou pendant le stockage, l'infection devient active quand les conditions d'anaérobioses et de températures deviennent favorables (Perombelon and Kelman, 1980).

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc* ; ex *Erwinia carotovora carotovora*) est une bactérie opportuniste qui affecte une gamme d'hôtes très large (légumes, tournesols, tabac, etc.) dans des aires géographiques étendues (régions tropicales et tempérées). Psychotrophe, elle est capable de se développer à des températures allant de 20°C à 30°C (Pérombelon, 2002) et elle est souvent isolée à partir des pourritures humides des organes de réserve et des pourritures aériennes des tiges (Toth et al., 2003b).

*Pectobacterium atrosepticum* (*Pa* ; ex *Erwinia carotovora atroseptica*) est une bactérie limitée essentiellement aux pommes de terre. Généralement associée aux symptômes de la jambe noire dans les zones tempérées à climat frais et humide. (Helias et al., 1998; Toth et al., 2003b).

*Dickeya dadantii* (ex *Erwinia chrysanthemi*) est l'une des entérobactéries phytopathogènes qui peut causer la pourriture molle dans un large éventail de cultures économiquement importantes

(Grenier et al., 2006). Elle s'exprime préférentiellement dans les régions tropicales et subtropicales à des températures optimales assez élevées (35-37°C).

### **1.6. Isolement et identification des *Pectobacterium* sp.**

Plusieurs tests sont utilisés pour identifier les *Pectobacterium* associés aux pourritures molles de pomme de terre, des tests phénotypiques, biochimiques et moléculaires. Le choix d'une méthode dépend essentiellement à la fois de l'ampleur de l'opération et de son coût, qui est en partie liée à l'expertise et les installations disponibles ainsi que le degré de précision nécessaire.

#### **1.6.1. Tests phénotypiques et biochimiques**

Les entérobactéries responsables de pourriture molle sont relativement faciles à cultiver. Lors de ces dernières décennies, des milieux à base de calcium et de pectate ont été largement utilisés pour isoler les *Pectobacterium* sp. Ces milieux semi-sélectifs, tel que le milieu cristal violet pectate (CVP) (Cuppels and Kelman, 1974) inhibent la croissance de nombreuses espèces bactériennes. Les *Pectobacterium* sont identifiés phénotypiquement sur ce milieu par la formation de cavités volumineuses. Cependant, ces identifications restent souvent provisoires et insuffisantes pour une discrimination interspécifique.

Le tableau 1 décrit le principe des différents tests phénotypiques et biochimiques permettant la distinction des *Pectobacterium*.

**Tableau 1.** Résumé des Tests phénotypiques et biochimiques pour distinguer les *Pectobacterium sp.*

Test	Principe	Référence
<b>Coloration Gram</b>	Permet de différencier entre les bactéries selon les propriétés de la paroi. Les bactéries Gram positives se colorent en violet, les bactéries Gram négatives en rose.	(Schaad et al., 2001)
<b>Test de pourriture</b>	Permet de mettre en évidence l'activité pectinolytique des souches de <i>Pectobacterium sp.</i> sur les tubercules, par apparition de la pourriture molle autour du site de l'inoculation. Le poids, le diamètre et la nature de la macération sont enregistrés.	(Bourgeois, 1993; Krejzar et al., 2008)
<b>Test de l'oxydase</b>	Permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le N diméthyl paraphénylène diamine. Une colonie bactérienne prélevée sur gélose est écrasée sur un disque pré-imprégné par le réactif. L'apparition d'une tache violette (réaction d'oxydation) révèle la présence de l'enzyme. ( <i>Pectobacterium est oxydase négative</i> )	(Schaad et al., 2001; Baghaee-Ravari et al., 2011)
<b>Test de la catalase</b>	L'enzyme catalyse la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène). L'inoculum bactérien est prélevé sur gélose et mise en suspension dans une goutte d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> préalablement déposée sur une lame. La présence d'une catalase se traduit par l'apparition de bulles. ( <i>Pectobacterium est catalase positive</i> )	(Schaad et al., 2001; Baghaee-Ravari et al., 2011)
<b>Test de la lécithinase</b>	Permet de mettre en évidence la présence du <i>Dickeya dadantii</i> (ex <i>Erwinia chrysanthemi</i> ). L'action de la lécithinase libère de la choline soluble et un diglycéride peu soluble qui précipite dans le milieu provoquant un trouble autour de la colonie.	(Lelliott and Stead, 1987 )
<b>Test de la gélatinase</b>	La protéase permet d'hydrolyser le collagène en acides aminés ou en peptides. La majorité des <i>Pectobacterium carotovorum</i> dégrade la gélatine à l'exception de quelques sous espèces. Dans une galerie API 20 E, la recherche de l'enzyme se fait dans le tube marqué GEL (Liquéfaction de la gélatine - protéine).	(Thomson et al., 1981)
<b>Production de gaz à partir de glucose</b>	Le milieu Kligler (milieu semi-solide) permet de révéler la présence de 4 caractères : l'utilisation du glucose et du lactose (fermentation du glucose, l'oxydation du lactose), la production de H <sub>2</sub> S et la production de Gaz. Il permet de définir la voie métabolique des glucides. La voie de fermentation/oxydation est révélée par l'acidification du milieu détectée par un virage de couleur du rouge au jaune.	(Helias et al., 1998)
<b>Croissance à 37°C</b>	Les incubations à 37°C, favorise la croissance des <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> ( <i>Pcc</i> ).	(Baghaee-Ravari et al., 2011)

<b>Production d'indole</b>	Permet d'identifier entre autre, les <i>Pcc</i> des autres <i>Pectobacterium sp.</i> Le milieu ALMT combiné au milieu Ayers permet l'acidification du lactose (couleur jaune), l'alcalinisation du malonate (couleur bleu) et la production d'indole à partir du tryptophane (Apparition d'un anneau rouge dans la phase alcoolique du réactif de Kovacs	(Helias et al., 1998)
<b>Production de pigment</b>	Le milieu King B permet d'éliminer les faux positifs, telles que <i>Pseudomonas sp</i> connues aussi par leur capacité de former des cavités sur CVP. La couleur jaune-vert fluorescent indique la présence de pyoverdine sous UV.	(Helias et al., 1998; Baghaee-Ravari et al., 2011)
<b>Réduction des Nitrates</b>	L'Eau Peptonée Nitratée (EPN) permet d'identifier l'activité du nitrate réductase après l'ajout de deux réactifs : Nitrate réductase et Nitrite réductase. La recherche de l'enzyme se fait dans le tube marqué GLU (API 20 E).	(Marchal N et al., 1982)
<b>Test de l'activité pectinolytique</b>	Le milieu Sutton (milieu semi-solide) permet la révélation de l'activité pectinolytique. Le <i>Pectobacterium sp</i> acidifie et liquéfie le milieu, ce qui permet d'écarter les <i>Pseudomonas</i> et <i>Flavobacterium</i> qui se révèlent incapables de l'acidifier. L'activité pectinolytique est révélée par l'acidification du milieu détectée par un virage de la couleur du milieu au jaune. La révélation de l'activité peut être aussi réalisée dans un milieu à base du PGA (milieu M63).	(Miller, 1972 ; Helias, 1999)
<b>Production d'acide à partir de :</b>		
<b>Glucose</b>	Le milieu de Hugh et Leifson (milieu semi-solide) permet de définir type respiratoire de la bactérie en métabolisant le glucose. La voie fermentation/oxydation est révélée par l'acidification du milieu détectée par un virage de couleur du vert au jaune.	(Schaad et al., 2001)
<b><math>\alpha</math>-méthyl-D-glucoside</b>	Permet de mettre en évidence la présence du <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (ex <i>Erwinia carotovora atroseptica</i> ). Utilisation du $\alpha$ -méthyl-D-glucoside provoque une acidification du milieu (couleur jaune).	(Helias, 1999)
<b>Sorbitol Melibiose Arabitol Lactose</b>	Le milieu Ayers est un milieu de base dans lequel sont ajoutés les différents hydrates de carbone (sorbitol, méliobiose, D-arabitol ou tréhalose) dont on veut déterminer l'utilisation par <i>Pectobacterium sp.</i>	(S. Henry Ayers, 1919)
	Le milieu Kligler (décrit ci-dessus).	(Kligler, 1917)



### 1.6.2. Tests moléculaires

Les techniques de biologie moléculaire reposent sur l'emploi de quatre outils de base : Les enzymes (polymérase et enzymes de restriction), l'hybridation de sondes spécifiques, l'électrophorèse en gel et le séquençage. Ces outils sont basés en grande partie sur les réactions de polymérisation en chaîne (PCR, Polymérase Chain Réaction) qu'on peut diviser en deux catégories ; les réactions d'identification et les réactions de caractérisation d'isolat. Ces réactions ont tous été développées avant la description de nouvelles sous-espèces de *Pectobacterium* (ex *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*). Ainsi, l'efficacité de détection et de diagnostic de ces réactions repose sur la qualité des amorces choisies (tableau 2). La plupart de ces essais ont été également mis au point avant l'utilisation généralisée de la PCR en temps réel (Kim et al., 2012) et des puces à ADN. Toutefois, malgré les avantages que présentent ces méthodes en termes de sensibilité, précision et reproductibilité, la PCR conventionnelle et le choix des amorces restent de nos jours l'outil de diagnostic moléculaire des *Pectobacterium* le plus utilisé.

Par ailleurs, La combinaison de la PCR à d'autres techniques moléculaires (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism ; RAPD, Random Amplified Polymorphic ; puce à ADN ou encore le séquençage) a permis en plus de l'identification et de la caractérisation des souches, la classification et la découverte de nouvelles espèces. Elle a permis aussi l'étude de la diversité génétique des espèces et sous espèce de *Pectobacterium*.

Toth et al. (2001) a décrit l'utilisation de la 16S-23rRNA Sequence Intergénique Transcrite combinée avec la PCR (ITS-PCR) suivie par polymorphisme de restriction (ITS-RFLP) comme outils de base pour l'identification et la différenciation de *Pectobacterium* sp. Deux années plus tard, Fessehaie et al. (2003) décrit une méthode basé sur le principe d'hybridation, utilisant une matrice d'oligonucléotides pour la détection, entre autre, de *Pectobacterium*. Récemment une nouvelle approche dite multilocus basée sur l'amplification des gènes constitutifs (*acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi*, et *proA*) a été utilisée pour analyser la phylogénie des sous espèces de *Pectobacterium* (Ma et al., 2007).

**Tableau 2.** Résumé des principales amorces utilisées dans l'identification des *Pectobacterium* associés aux pourritures molles de pomme de terre

Test	Amorce	Séquence (5' → 3')	Espèce	Référence
ITS-PCR	G1	GAAGTCGTAACAAGG	<i>Pectobacterium</i> sp.et	(Toth et al., 2001)
	L1	CAAGGCATCCACCGT	<i>Dickeya dadantii</i>	
PCR	Y1	TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT	<i>Pectobacterium</i> sp.	(Darrasse et al., 1994)
	Y2	CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT	à l'exception de <i>Pcb</i>	
Rep-PCR	REP1R	IIICGICGICATCIGGC	<i>Pectobacterium</i> sp.	(Versalovic et al., 1991)
	REP2I	ICGICTTATCIGGCCTAC		
MSP-PCR	csM13	GAGGGTGGCGGTTCT	<i>Pectobacterium</i> sp.	(Versalovic et al., 1996; Costa et al., 2006)
BOX-PCR	A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG		
SREs-PCR	SR3F	GGTGCAAGCGTTAATCGGAATG	<i>Pectobacterium</i> sp.	(Toth et al., 1999a)
	SR1cR	AGACTCTAGCCTGTCAGTTTT		
Nested PCR	INPCCR	GGCCAAGCAGTGCCTGTA TATCC	<i>Pcc</i>	(Kang et al., 2003)
	INPCCF	TTCGATCACGCAACCTGCATTACT		
URPs-PCR	EXPCCF	GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA	<i>Pcc</i> et <i>Pcw</i>	(Kang et al., 2003)
	EXPCCR	GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG		
PCR	contig1F	CCTGCTGGCGTGGGGTATCG	<i>Pcc</i>	(de Haan et al., 2008)
	contig1R	TTGCGGAAGATGTCGTGAGTGCG		
ERIC-PCR	ERIC2	GCGAGTGGGGTCAGTGAATGAA	<i>Pa</i>	(Toth et al., 1999c)
	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC		
PCR	ECA1f	CGGCATCATAAAAACACG	<i>Pa</i>	(Deboer and Ward, 1995)
	ECA2r	GCACACTTCATCCAGCGA		
PCR	ADE1	ATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT	<i>Dickeya dadantii</i>	(Nassar et al., 1996)
	ADE2	CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC		

**ITS:** Intergenic Transcribed Spacer**Rep:** Repetitive**MSP:** MiniSatellite Primer**SREs:** Soft Rot Erwinias**URPs:** Universal rice primers**ERIC:** Enterobacterial Repetitive Intergenic  
Consensus**Pcc:** *Pectobacterium carotovorum*  
*carotovorum***Pa:** *Pectobacterium atrosepticum***Pcw:** *Pectobacterium carotovorum wasabiae***Pcb:** *Pectobacterium carotovorum*  
*betavascularum*

## 1.7. Pouvoir pathogène des bactéries pectinolytiques

### 1.7.1. Principaux facteurs de virulence

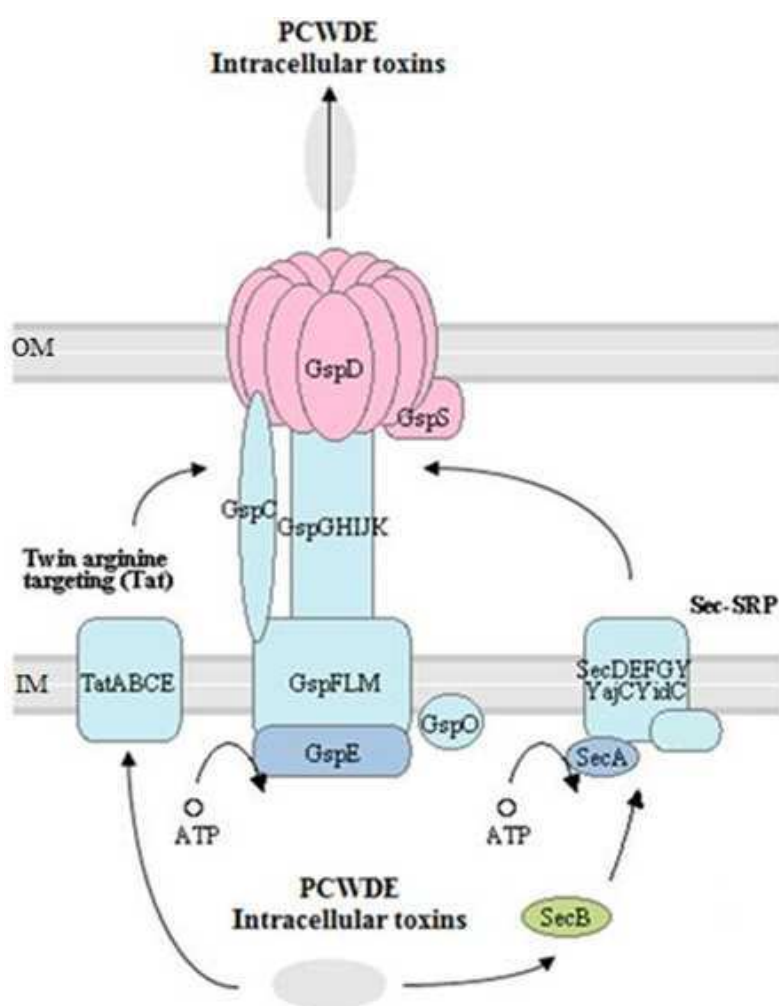
*Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*, *Pa* et *Dickeya dadantii* 3937 sont les trois bactéries pectinolytiques pour lesquelles les bases moléculaires qui déterminent leur pouvoir pathogène sont largement étudiées. Ces bactéries sécrètent, de façon synchrone et en réponse à un mécanisme de régulation appelé quorum sensing (décrit en paragraphe 2.8.2) l'ensemble des enzymes lytiques (pectate lyases, pectinases, polygalacturonase, cellulase, protéase, etc.) dont l'activité est responsable des symptômes de macération observables sur plants et tubercules (Charkowski, 2006). Cet arsenal enzymatique est particulièrement bien adapté à la dégradation de tous les composants des parois cellulaires végétales, ce qui explique l'ampleur des dégâts observés et leur vitesse d'apparition. Il existe d'autres mécanismes importants participant au pouvoir pathogène des *Pectobacterium* sp à savoir : la mobilité, l'acquisition du fer via la production des sidérophores, la formation de biofilm, le chimiotaxisme, etc.

Six systèmes de sécrétion permettant de sécréter les enzymes lytiques ou les facteurs de virulences sont développés par les bactéries Gram négatif et en particulier les *Pectobacterium* sp. Ils sont différenciés selon leur fonctionnement, l'assemblage de la machinerie et le type de substrats. Les systèmes de sécrétion de type I, III, IV et VI permettent une sécrétion en une seule étape, du cytoplasme au milieu extracellulaire ou directement dans la cellule-hôte. Les systèmes de type II et V permettent la translocation en deux étapes des protéines du périplasme à travers la membrane externe (Sandkvist, 2001).

#### 1.7.1.1. Système de sécrétion type II et dégradation de la paroi végétale

Le système de sécrétion de type II (T2SS, Type II Secretion System), ou voie générale de sécrétion (GSP, General Secretory Pathway) est largement exploité par les *Pectobacterium* pour sécréter une variété d'enzymes extracellulaires impliquée dans la dégradation des parois végétales de l'hôte (PCWDE, Plant Cell Wall Degrading Enzymes). Ces facteurs de virulence sécrétés sont les déterminants clés du pouvoir pathogène des *Pectobacterium* (Charkowski, 2006; Koiv et al., 2010). La sécrétion par le T2SS se passe en deux étapes. Les exo-protéines sont synthétisées avec une séquence signal N-terminale et traversent la membrane cytoplasmique par le système Sec ou Tat (figure 5). Une fois dans le périplasme elles se replient et sont transportées à travers la membrane externe par une nano-machine composée

de 14 à 16 protéines (T2SS) vers le milieu extracellulaire (Sandkvist, 2001; Ferrandez and Condemine, 2008).



**Figure 5.** Système de sécrétion type II de *Pectobacterium carotovorum*, modifié d'après KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2010).

Abréviations: Plant cell wall degrading enzymes (PCWDE), outer membrane (OM), inner membrane (IM), general secretory pathway (GSP), secretion system (Sec), adenosine triphosphate (ATP).

### Protéines de virulence sécrétées par le T2SS

La paroi végétale est composée de polysaccharides, protéines, composés aromatiques et aliphatiques, qui donnent leur rigidité aux tissus végétaux. Les polysaccharides sont classés en trois types : la pectine l'hémicellulose et la cellulose. La pectine est composée principalement de polymères linéaires d'acide  $\alpha$  1,4-polygalacturonique (PGA) qui représentent 60% des

pectines de la paroi végétale et de polymères ramifiés connues sous le nom de rhamnogalacturonanes I et II (Caffall and Mohnen, 2009). Les polygalacturonates sont généralement estérifié et lié de manière covalente aux rhamnogalacturonanes I et II (Willats et al., 2001). Les *Pectobacterium* responsables des pourritures molles codent pour une large gamme d'enzymes pectinolytiques (PCWDE, pectinases et cellulase) agissant en synergie pendant les différentes phases de l'infection pour dépolymériser les parois végétales de l'hôte (tableau 3). Toutes ces enzymes sont sécrétées dans le milieu externe par le T2SS codé par l'opéron *out* (Sandkvist, 2001).

**Tableau 3.** Enzymes pectinolytiques secrétées par le T2SS des *Pectobacterium* sp. modifié d'après Charkowski (2006).

	Enzyme	Protéine	Souche	Reference
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Cellulase	CelV1	SCC3193	(Mäe et al., 1995)
		CelS		(Saarilahti et al., 1990a)
	Endo-pectate lyases	Pel1	Ecc71	(Chatterjee et al., 1995)
		Pel3		(Liu et al., 1994)
		PelB	SCRI193	(Hinton et al., 1990)
		PelC		(Hinton et al., 1990)
		Pel1	ER	(Ito et al., 1988)
		PelX		(Ito et al., 1988)
		Pel2		(Yoshida et al., 1992)
		Pel3		(Yoshida et al., 1991)
		PelB	SCC3193	(Heikinheimo et al., 1995)
	Pectine lyase	PnlA	Ecc71	(McEvoy et al., 1990)
		Pnl		(Pirhonen et al., 1991)
	Endo-polygalacturonase	Peh-1	Ecc71	(Liu et al., 1994)
		Peh	SCRI193	(Hinton et al., 1990)
		PehA	SCC3193	(Saarilahti et al., 1990b)
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Cellulase	Cel		(Lanham et al., 1991)
	Pectate lyase	PelA (Pel1)	SCRI1043	(Bell et al., 2004)
		PelB (Pel2)		
		PelC (Pel3)	C18	(Bartling et al., 1995)
		Pel1		
		Pel2		
		Pel3	EC	(Lei et al., 1988)
	Polygalacturonase Fonction inconnue	PelA		(Lei et al., 1987)
		PelB		
		PG		(Lanham et al., 1991)
		SVX	SCRI1043	(Corbett et al., 2005)
<i>Dickeya dadantii</i>	Cellulase	CelY	3665	(Guisseppi et al., 1991)
		CelZ		(Boyer et al., 1984)
	Endo-pectate lyases	PelA	3937	(Favey et al., 1992)
		PelB	3937	(Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992)
		PelC	3937	
		PelD	3937	
		PelE	3937	(Reverchon et al., 1989)
		PelI	3937	(Shevchik et al., 1997)
		PelL	3937	(Lojkowska et al., 1995)
		PelZ	3937	(Pissavin et al., 1996)
		PelX	3937	(Shevchik et al., 1999)
	Exo-pectate lyases			
	Pectine acétyl estérase	PaeY	3937	(Shevchik et al., 1997)
	Pectine méthylestérase	PemA	3937	(Laurent et al., 1993)
		PemB	3937	(Shevchik et al., 1996)
	Pectine lyase		3937	(Glasner et al., 2003)
	Polygalacturonase	PehN	3937	(Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2002)
	Rhamnogalacturonate Lyase	RhiE	3937	(Laatu and Condemine, 2003)

**Les pectate lyases** (Pel) jouent un rôle majeur dans le catabolisme de la pectine. Six isoenzymes de pectate lyase codées respectivement par les gènes *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE* et *pelY* sont produites par les *Pectobacterium*. Ces gènes sont organisés en trois clusters, *pelADE*, *pelBC* et *pelY*. Les protéines PelA, PelD et PelE sont homologues, de même que PelB et PelC, ce qui suggère que des duplications de gènes récentes sont à l'origine de ces isoenzymes (Pissavin et al., 1996). Chaque gène *pel* est transcrit sous le contrôle de son propre promoteur. Aucun gène *pel* n'est indispensable à la virulence (Beaulieu et al., 1993). D'autres pectate lyases codées par les gènes *pelL*, *pelI*, *pelX* et *pelZ* ont été identifiées et impliquées dans le pouvoir pathogène de ces bactéries (tableau 3). Toutefois, la plupart des Pels fonctionne mal à pH acide, condition rencontrée au niveau de l'apoplasme lors de l'invasion des bactéries dans la plante (Pérombelon, 2002).

**D'autres pectinases** sont aussi impliquées dans le pouvoir pathogène des bactéries pectinolytiques. Le nombre et le types de ces enzymes varient d'une espèce à l'autre. On trouve les pectines lyase (*Pnl*), les pectines méthylestérases (*PemA*), les pectines acétylestérases (*PaeX* et *Y*) (Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997), et les polygalacturonases (*Peh*) avec de multiples formes d'isoenzymes (*PehN*, *PehV* et *PehW*).

**Les Polygalacturonases** (Peh) attaquent les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques produisant ainsi des produits saturés. Deux polygalacturonases différentes ont été caractérisées, l'exo et l'endo-Peh. Les endo-Pehs extraient à partir des souches *Pcc* montrent une forte homologie de 95% au niveau des acides aminés (Liu et al., 1994). La production de Peh<sub>SCC3193</sub> a été proposée pour jouer un rôle important dans la phase initiale de l'infection, et sa production a été clairement réprimée par le calcium, ce qui reflète la rupture des parois des cellules végétales (tableau 3).

**Les Cellulases** (Cel) sont des endohydrolyses des liaisons 1,4- $\beta$ -D-glucosidiques de la cellulose. Leur pH optimal est de près de 7, et elles sont censés agir en synergie avec les autres enzymes extracellulaires précitées pour attaquer les parois des cellules primaires et secondaires des plantes (Toth et al., 2003b). Le gène CelV1<sub>SCC3193</sub> par exemple, code pour une cellulase d'une homologie d'acides aminés de 93% par rapport au CelV<sub>SCRI193</sub>. Ainsi, des mutants CelV1<sub>SCC3193</sub> ont montré une grande diminution de la capacité de macération sur les feuilles de tabac par rapport au type sauvage, en particulier au début de l'infection. L'inactivation du gène CelS au niveau des mutant CelV1 ne conduit pas à une nouvelle

diminution de la virulence, ce qui suggère que CelS<sub>SCC3193</sub> pourrait être important dans l'infection des plantes hôtes au cours de la croissance saprophytique (Mäe et al., 1995).

D'une manière générale, ces enzymes pectinolytiques agissent de façon synergique et leurs effets sont additifs. La redondance des enzymes, surtout dans le cas des pectate lyases, explique que chaque enzyme ne contribue pas de façon individuelle au pouvoir pathogène de la bactérie. Cependant, dans certains cas, la mutation d'une seule enzyme suffit à affecter significativement la capacité de macération de la bactérie (Shevchik et al., 1999).

#### 1.7.1.2. Système de sécrétion type I et sécrétion des protéases

Le système de sécrétion de type 1 (T1SS, Type I Secretion System) est le plus simple des systèmes de sécrétion. Il est constitué de trois protéines (PMF, ABC et TolC) assurant la sécrétion en une seule étape d'exo-protéines caractérisées par un signal de sécrétion en C-terminal (Holland et al., 2005). Les protéases (Prt) des *Pectobacterium* sont les principales exo-protéines secrétées par ce système. *Dickeya dadantii* E16 par exemple, produit au moins quatre métalloprotéases PrtA, B, C, et G via le T1SS codées par les gènes *PrtD*, *E* et *F* nécessaire au pouvoir pathogène de la bactérie (Boyd and Keen, 1993).

#### 1.7.2. Autres facteurs affectant la pathogénie

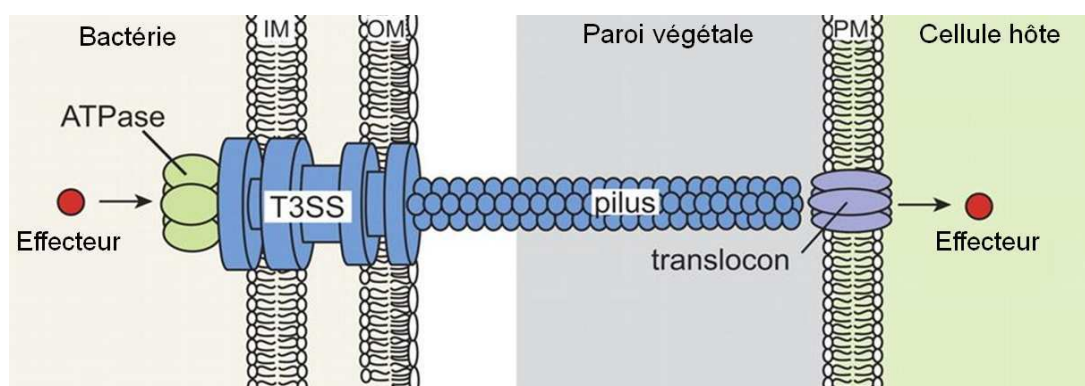
Les PCWDE et les protéases sont les principaux facteurs responsables du développement des symptômes de la pourriture molle. Toutefois, d'autres facteurs affectent également l'installation et la progression de l'infection, ainsi que l'induction des mécanismes de défenses chez l'hôte. Ces facteurs comprennent les effecteurs des systèmes de sécrétion de type III, la mobilité, les lipopolysaccharides et exopolysaccharides et les sidérophores. Par souci de concision, le rôle de quelques paramètres physico-chimiques dans la pathogénie des *Pectobacterium* ne seront pas décrits dans cette thèse.

##### 1.7.2.1. Système de sécrétion de type III et effecteurs

A la différence des deux premiers systèmes de sécrétion d'enzyme lytiques cités au-dessus, le système de sécrétion de type III (T3SS) permet l'injection d'effecteur dans la cellule hôte (figure 6). Il est constitué de nombreuses sous-unités formant un translocon qui assure le passage de l'effecteur à travers les membranes cellulaires (Ghosh, 2004). Il présente des



similarités de séquences avec les protéines impliquées dans la biogénèse du flagelle (Büttner and He, 2009).



**Figure 6.** Représentation schématique du T3SS d'une bactérie phytopathogène, d'après Büttner and He (2009).

Le T3SS a été largement étudié chez d'autres bactéries phytopathogènes telle que *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris*, pour lesquelles il est essentiel au pouvoir pathogène. Il est moins étudié chez les *Pectobacterium* responsables de la pourriture molle (Arnold et al., 2003). On connaît à l'heure actuelle plusieurs dizaines d'effecteurs dont le nombre et le type varient d'une espèce à l'autre et dont le rôle est souvent difficile à déterminer du fait d'une redondance fonctionnelle. Parmi les principaux gènes d'effecteurs caractérisés chez le *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*), il y a les *hecAB* et *dspAB(EF)* (Arnold et al., 2003).

Holeva et al. (2004) ont observé une baisse considérable de l'agressivité de *Pa* lors de mutations de gène *dspE/A*, *hrpN* et de deux gènes structuraux (*hrcC* et *hrcV*) liés au T3SS. Aussi, la capacité des *Pa* à induire la macération du tissu végétal des tubercules de pomme de terre a été affectée chez des mutants T3SS (Aghabozorgy and Niakan, 2009). Une autre étude a montré que l'exportation extracellulaire d'une bactériocine (Carocin S1) chez le *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* pourrait utiliser le système de sécrétion type III (Chan et al., 2009).\*

#### 1.7.2.2. Mobilité

La mobilité a été décrite comme un facteur de pathogénie chez *Pectobacterium* sp., car il semble être nécessaire pour la réussite de l'invasion et l'infection des plantes et en particulier

des tubercules de pomme de terre. La combinaison de la mobilité et du chimiotactisme permet aux bactéries de détecter et rejoindre leurs niches écologiques préférées. Des mutants non mobiles des souches *Pcc* révèlent une virulence atténuée malgré la présence des PCWDE. Ces souches sont mutées au niveau des gènes *mop* codant des protéines homologues aux protéines d'assemblage et de sécrétion des flagelles chez *Salmonella* *Bacillus* *Shigella* *Yersinia* et *Pseudomonas*. L'apport de ces gènes sauvages restaure à la fois la mobilité bactérienne et la virulence. Ainsi, les flagelles auraient un rôle non négligeable dans le pouvoir pathogène des *Pectobacterium* (Mulholland et al., 1993; Lautier, 2007).

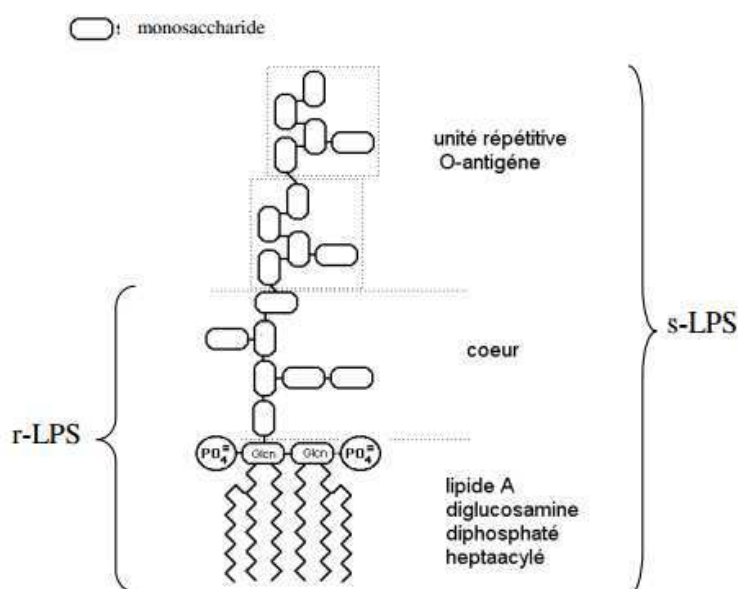
### 1.7.2.3. Sidérophores

En tant que co-facteur de nombreux processus cellulaires, le fer contribue à l'adaptation de la bactérie au cours de son cycle de vie et a donc un rôle indirect dans le pouvoir pathogène. Pourtant, il est présent à de très faibles concentrations ( $10^{-9}$ M dans le sol et dans l'eau), et sous la forme d'ions ferriques  $\text{Fe}^{3+}$  presque totalement insolubles (Ferguson and Deisenhofer, 2002). Pour capter le fer, les bactéries produisent ce que l'on appelle sidérophores. Ce sont des composés chimiques de faible poids moléculaire (500-1500 Da) produits par les bactéries et les champignons, capables de fixer le fer et d'être importés dans les cellules sous la forme de complexes fer-sidérophores. Il existe 3 classes de sidérophores, qui se distinguent par leur structure chimique : les catécholates, les hydroxycarboxylates et les hydroxamates. *Pectobacterium* sp. requiert une concentration en fer d'au moins  $10^{-6}$  M pour survivre. Ainsi, chez *Dickeya dadantii*, des mutants non producteurs de chrysobactine ou d'achromobactine sont très affectés dans leur pouvoir pathogène (Franza et al., 2005). Par ailleurs, l'expression de gènes codant pour certaines pectate lyases (*pelB*, *C*, *D* et *E*) de *Dickeya dadantii* est induite lors d'une carence en fer, et réprimée par la protéine Fur en présence de fer dans le milieu (Franza et al., 2002; Franza et al., 2005). Ce couplage entre deux fonctions essentielles au pouvoir pathogène de la bactérie, la production d'enzymes pectinolytiques et l'acquisition du fer, confère un avantage à la bactérie au cours du processus d'infection.

La production des sidérophores en cas de carence en fer, constitue un majeur facteur de virulence chez *Pectobacterium* sp (Boughammoura et al., 2007; Dellagi et al., 2009). Ce qui a pour conséquence une déficience en fer pour la plante hôte provoquant une diminution de la synthèse de la chlorophylle, un arrêt de cycle de Calvin et ainsi l'affaiblissement du système de défense de l'hôte (Klaus, 2001).

## 1.7.2.4. Lipopolysaccharides

Le lipopolysaccharide (LPS) est une macromolécule de surface majoritaire des bactéries à Gram négatif. Sur le plan structural, le LPS est constitué d'un lipide A ancré dans la membrane externe, d'un oligosaccharide (ou « core ») et d'un polysaccharide appelé antigène O (ou chaîne O) (Erbs and Newman, 2012). Leur nom provient de la forme qu'ils donnent aux colonies bactériennes. Lorsque les colonies présentent un contour irrégulier, ils sont appelés r-LPS : r pour « rough ». Lorsque les colonies présentent des contours réguliers les LPS sont dits s-LPS, s pour « smooth ». Les rLPS ne sont constitués que d'un lipide A et d'un oligosaccharide de cœur. Les s-LPS sont quant à eux composés d'un lipide A, d'un oligosaccharide de cœur et des unités répétitives formant l'antigène de type O (Figure 7).



**Figure 7.** Schéma structural des LPS d'après Chataigne (2007).

La composition et la structure du LPS de *Pectobacterium* ont été déterminées par Sandulache et al. en 1985 : la fraction lipidique est composée de deux glucosamines reliés entre eux par une liaison de type  $\beta$ -1,6 phosphorylés et liés à des acides gras. La fraction carbohydate est composée : i) d'une chaîne courte (chaîne O ou antigène O) composée de sous-unités répétées de trois sucres neutres : fucose, glucose et galactose et est responsable de la spécificité antigénique O permettant de décrire des sérovars au sein d'une même espèce bactérienne, ii) d'un « core » contenant des oligosaccharides (heptose, glucose) et de l'acide 3-desoxy-D-mano-2-octulosonique (KDO) (Fukuoka et al., 1992; Czerwicka et al., 2011).

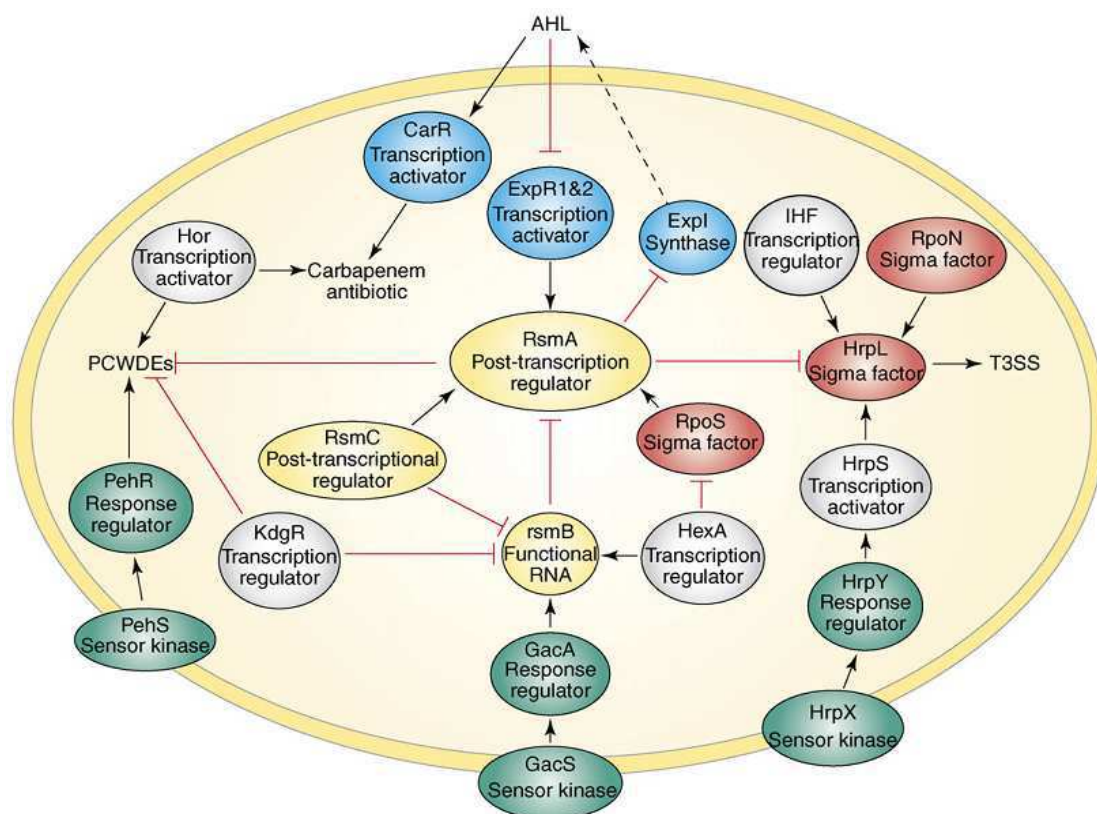
Le LPS participe la protection physique des cellules bactériennes en contribuant à réduire la perméabilité membranaire, permettant ainsi la croissance bactérienne dans un environnement défavorable. Ils jouent également un rôle dans l'adhérence, notamment chez *Agrobacterium tumefaciens* et *Vibrio cholerae* (Reuhs et al., 1997; Merrell et al., 2002).

Chez le modèle animale, le LPS est considéré comme une endotoxine qui est relâchée en grande quantité lors de la lyse cellulaire. Sa toxicité est variable et dépend en particulier de sa composition chimique qui est en fonction de l'espèce bactérienne. Le lipide A est généralement responsable de la toxicité de la molécule. Au cours des septicémies, la lyse bactérienne peut être à l'origine d'un choc endotoxinique *via* une libération massive de lipopolysaccharides (Lautier, 2007). Cependant, ces mêmes molécules peuvent avoir divers rôles dans la pathogénie bactérienne chez les plantes. Les bactéries à Gram négatif ont développé des mécanismes pour modifier la structure du lipide A en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent, et ces modifications peuvent favoriser la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (Zhou et al., 2001). D'autres études montrent qu'une mutation dans la biosynthèse du LPS réduit considérablement la gravité des symptômes ainsi que le nombre de bactéries viables dans le tissu végétale (Newman et al., 2001). En effet, un mutant dans le gène *rfp*, essentiel pour la synthèse des LPS, présente une colonisation de l'hôte mille fois plus faible par rapport à la souche parentale (Merrell et al., 2002). Chez *Pectobacterium atrosepticum*, un mutant altéré dans la synthèse de LPS présente une virulence diminuée (Toth et al., 1999b). Ils pourraient fournir une protection contre des substances antimicrobiennes dans les tubercules de pommes de terre, mais de manière générale, ces LPS ne sont pas considérés comme un facteur essentiel du pouvoir pathogène puisque certains mutants LPS-défectueux de *Pcc* restent tout de même virulents (Perombelon, 2002 ; Toth et al., 1999b).

Par ailleurs, le LPS en tant que motif moléculaire conservé chez les bactéries gram négatif constitue une "molécule signature" (MAMP, microbe associated molecular pattern) permettant la reconnaissance de la bactérie par la plante. Cet évènement clé de l'immunité innée demeure inconnu. De part cette caractéristique, le LPS possède une activité élicitrice de réponses de défense en activant différentes voies de signalisation moléculaire et cellulaire chez la plante. Les principales voies de signalisation feront l'objet du paragraphe 3 de cette revue bibliographique.

### 1.8. Régulation des gènes de virulences chez *Pectobacterium* sp.

Les bactéries régulent leurs expressions géniques par divers mécanismes. La régulation des gènes de virulence de *Pcc* implique des circuits complexes de régulation (figure 8) qui répondent à différents stimuli environnementaux. Ces composants comprennent principalement des systèmes de régulation à deux composants (TCS, Two Component System) et le système quorum-sensing (QS) (Hyytiäinen, 2005).



**Figure 8.** Régulation globale de l'expression des gènes de virulence de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, d'après Mole et al. (2007).

Code couleur: bleu, associé au système de communication cellule-à-cellule ; vert, les systèmes TCS; rouge, les facteurs sigma ; jaune, une partie du système Rsm ; gris, d'autres membres régulateurs qui sont pas décrits en détail ici. Les flèches représentent la régulation positive ; les flèches barrées représentent la régulation négative ; les flèches en pointillés représentent la synthèse.

#### 1.8.1. Systèmes de régulation à deux composants (TCS)

Les systèmes de régulation à deux composants sont définis comme les premiers mécanismes de transduction de signal chez les bactéries. Ils sont composés d'un senseur du signal souvent membranaire et d'un régulateur cytoplasmique de réponse. La première composante est une

kinase qui transmet par autophosphorylation, le signal reçu à une phosphatase. Cette deuxième composante régule la réponse de la cellule en fonction de la nature du signal (Mitrophanov and Groisman, 2008). Plus de 30 systèmes à deux composantes sont présents chez les *Pectobacterium* responsable de la pourriture molle des pommes de terre et plusieurs d'entre eux sont impliqués dans la régulation des gènes de virulence.

**Le système GacA/GacS** (également appelées ExpS et ExpA) est présent chez les *Pcc*. Ils régulent positivement la production des Prt, Peh, Pel, Cel, et HrpN (Eriksson et al., 1998). Cette régulation n'est pas directe mais elle se fait via le système RsmC-RsmA-rsmB (Hyytiäinen et al., 2003). Le système Gac est particulièrement bien conservé chez les *Pseudomonas*. L'équipe de Raaijmakers a d'ailleurs montré que le gène *gacA* peut être utilisé comme marqueur moléculaire en complément de l'ARNr 16S actuellement utilisé (de Souza et al., 2003).

**Le système PehR/PehS** de *Pcc* est homologue au PhoP-PhoQ des agents pathogènes du model animal. Il contrôle la production de Peh en réponse au calcium (Flego et al., 2000). Une mutation de l'un des deux composants du système PehR/PehS élimine essentiellement la production de polygalacturonase et provoque une réduction de la virulence. La sécrétion de pectate lyases ou des cellulases reste intacte.

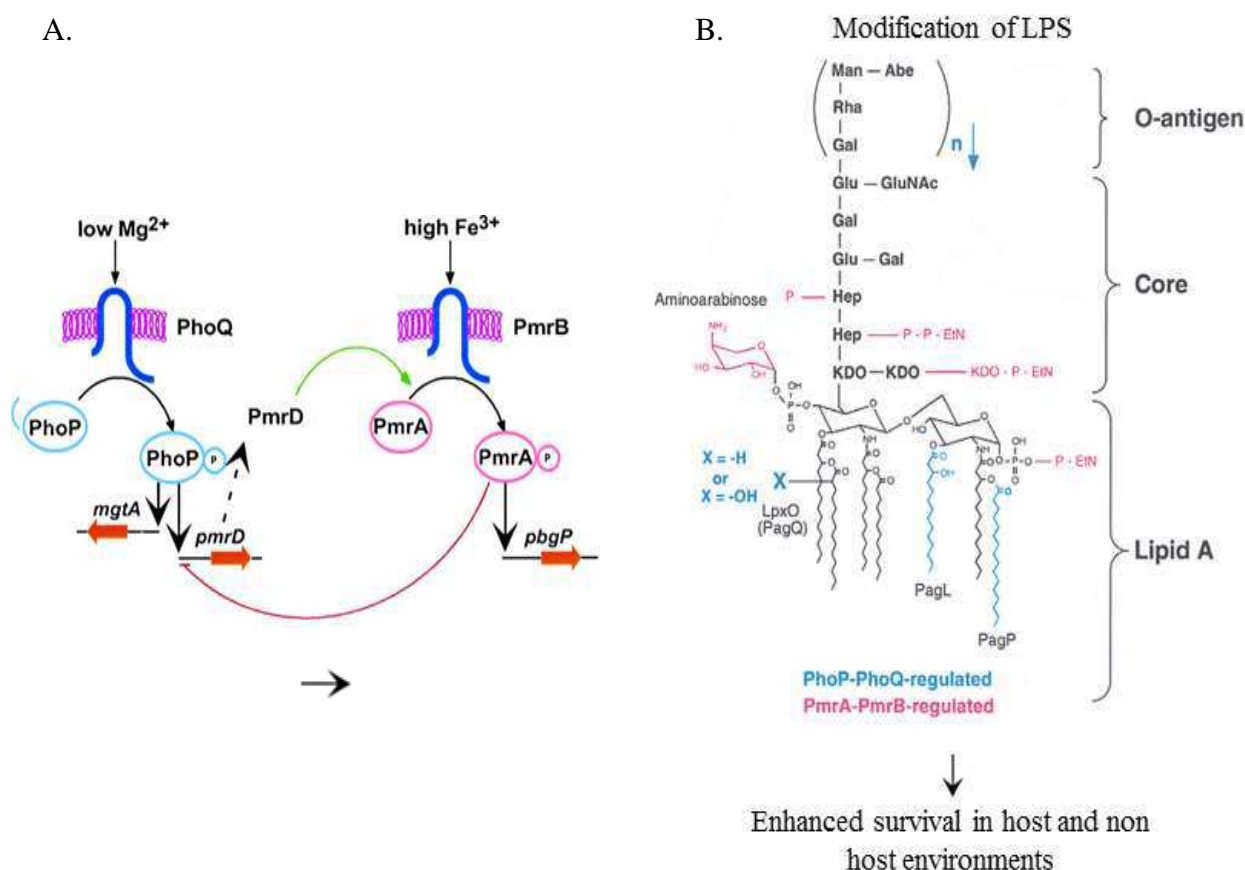
**Le système PhoP/PhoQ** de *Dickeya dadantii* EC16 a été identifié chez des mutants incapables de croître à pH acide (Llama-Palacios et al., 2003). Le mutant PhoQ est également sensibles aux protamines antimicrobiennes et au  $Mg^{2+}$  qui affectent la production de Peh in vitro. Cependant, l'activité pectate lyase du mutant PhoQ n'a pas été réduite in vitro, mais plutôt in planta (Llama-Palacios et al., 2005). PhoP/PhoQ, est connue aussi pour contrôler le système PmrA/PmrB via une petite protéine régulatrice PmrD (figure 9) (Kato et al., 2003).

**Le système PmrA/PmrB** est l'un des systèmes conservés les plus étudiés chez les bactéries Gram négatifs en particulier *Pectobacterium*, *Salmonella*, et *Legionella* (Hyytiäinen et al., 2003; Perez and Groisman, 2007; Al-Khodori et al., 2009; de las Mercedes Pescaretti et al., 2011). Chez le *Pcc* SCC3193, les mutants PmrA (régulateur de réponse) et PmrB (activateur transcriptionnel) ont des effets opposés (Hyytiäinen et al., 2003). Le mutant PmrB de *Pcc* diminue la capacité de macération dans les tubercules de pommes de terre ainsi que dans les feuilles d'*Arabidopsis* et affecte la survie de la bactérie in planta. Cependant l'inactivation de la composante PmrA ne réduit pas significativement cette virulence. PmrB est requise pour

l'activation transcriptionnelle d'enzymes extracellulaires tel que ; CelV1, Peha, PelB, et PrtW alors que PmrA semble avoir un effet négatif sur l'expression de ces gènes.

Les effets opposés de mutations dans les gènes *pmr* peut être expliqués par la phosphorylation de PmrA. Cette composante une fois phosphorylée, agit comme un régulateur négatif des enzymes extracellulaires. Les protéines Expa et KdgR participe aussi à la régulation des PWCDE via le système rmsB-RsmA (Hyytiainen et al., 2001).

Le mutant PmrB est plus résistant à la polymyxine B tandis que le mutant *pmrA* est plus sensible, ce qui suggère que le système Pmr régule la synthèse et/ou la modification des LPS (figure 9). La faible concentration en  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  active aussi la production de Peh, ce qui provoque des dommages à la paroi cellulaire végétale.



**Figure 9.** Schéma simplifié de la régulation de la virulence par le système PmrA/PmrB d'après Ernst et al. (2001) et Kato et al. (2003).

(A) Modèle illustrant les interactions régulatrices entre les deux systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB. (B) Sites de modification de la structure LPS par les deux systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB.

Chez le *Pcc*, comme dans d'autres espèces, le système PmrA/PmrB est nécessaire à la survie en présence d'un excès de fer et à pH neutre (Hyytiäinen, 2005; Charkowski, 2006). Le système Pmr intervient donc dans le développement des symptômes et la survie des plantes par la régulation de l'expression de certains gènes de virulence et par modification des propriétés de surface des cellules (Charkowski, 2006).

**Le système HrpX/HrpY** régule le système de sécrétion type III (T3SS) et active la transcription des protéines HrpS. Ces dernières activent les HrpL qui à leur tour activent les gènes codant pour le T3SS et ses substrats (figure 8). Des *Pcc* à virulence réduite révèlent une surexpression des HrpX,, ce qui suggère que la modulation appropriée du T3SS est importante pour la pathogénie (Lehtimäki et al., 2003).

### 1.8.2. Quorum sensing (QS)

Ce système a été découvert au début des années 1990 et depuis, il est devenu le système le plus étudié chez un grand nombre de bactéries phytopathogènes à savoir ; *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ou *Xanthomonas* (González and Keshavan, 2006). Le QS est un mode de régulation qui couple chez les bactéries l'expression génique à la densité cellulaire. Il repose sur la synthèse et la perception de molécules signal (auto-inducteurs) par la population bactérienne concernée (Barnard et al., 2007). Ces molécules sont sécrétées par les bactéries et diffusent alors librement dans le milieu. Lorsque la population devient plus importante, la concentration en auto-inducteur augmente et dépasse un seuil critique qui est alors perçu par les bactéries qui le produisent : le quorum est atteint. L'auto-inducteur va ensuite former un complexe avec un facteur de transcription qui va pouvoir moduler l'expression de gènes de virulence. Parmi les signaux connus, on peut citer les N-acyl homosérine lactones (AHLs), les butyrolactones, les peptides cycliques tels ComX, ou l'autoinducteur 2 (AI-2).

Chez la bactérie *Pectobacterium atrosepticum* 6276 la N-3oxo-octanoyl-L-homosérine lactone est la principale AHLs. La seule inactivation du gène responsable de sa synthèse rend la souche non virulente. Située à l'interface entre les 2 événements de la pathogénie (multiplication cellulaire et macération), la production des AHLs intervient au moins de 8 à 28°C et est optimale à 24°C, comme la croissance bactérienne, suggérant l'absence de thermorégulation particulière (Diallo, 2007).



Chez les *Pcc*, 2 gènes principaux *luxR* et *luxI* sont impliqués dans ce mécanisme de régulation. Le système LuxI/luxR code pour une enzyme qui participe à la synthèse d'un auto-inducteur de la famille des AHLs. Ces auto-inducteurs vont s'accumuler dans le milieu extracellulaire au cours de la croissance et lorsque leur concentration atteint un seuil, vont interagir avec leur récepteur spécifique (LuxR). La formation du complexe LuxR/AHL entraîne la modulation de l'expression des gènes de virulence cibles, d'où le nom d'auto-inducteurs donné aux AHLs. Cette boucle d'auto-induction conduit à l'activation du système chez les bactéries voisines (González and Keshavan, 2006).

L'existence du signal de quorum-sensing chez toutes les espèces de *Pectobacterium* macergènes et son importance stratégique dans la maladie de pourriture molle désignent ce signal bactérien comme une cible privilégiée pour développer des outils de lutte contre la virulence des *Pectobacteria*. Ces stratégies d'antivirulence ont toutes pour vocation l'interruption de la signalisation quorum-sensing de *Pectobacterium* (Amy O, 2009; Fan et al., 2011; Mahmoudi et al., 2011a; Palmer et al., 2011)

## 2. Stratégies de lutte contre les *Pectobacterium* sp.

La lutte contre les maladies phytopathogènes est une préoccupation majeure de l'agriculteur. Chaque année, la production agricole mondiale est réduite de 12 à 14%, 15% des dommages étant d'origine bactérienne. Les pertes économiques causées par les maladies phytopathogènes, et l'absence de moyens de lutte efficaces motivent aujourd'hui le développement de recherches multidisciplinaires visant à protéger du mieux possible les cultures (Latour et al., 2008). Les différentes stratégies de lutte qui existent à l'heure actuelle, contre les maladies bactériennes des plantes et en particulier contre les *Pectobacterium* sp, sont des moyens de lutte physique, chimique, génétique et biologique.

### 2.1. La lutte physique

Si la manipulation soigneuse des plantes pendant la récolte et le stockage permet de réduire les blessures et limiter ainsi les possibilités d'infection par le pathogène, d'autres moyens de lutte physique permettent de lutter contre les *Pectobacterium* (Czajkowski et al., 2011). Différents moyens peuvent être mis en œuvre tels que : La ventilation d'air extérieur pendant le transport et les contrôles de température et d'humidité pendant le stockage sont des pratiques supplémentaires qui peuvent limiter l'infection ou la propagation du pathogène. Les producteurs ont aussi les moyens de limiter la pourriture molle pendant le stockage en éliminant les tubercules endommagés ou malades. De plus, des mesures sont à l'étude, visant à limiter la présence des pathogènes sur le tubercule après récolte et leur dissémination dans l'environnement. Moreau et al., (2005) envisagent l'utilisation de réacteurs de décontamination dont la technologie est basée sur l'émission de plasmas froids pour traiter les eaux de lavage des tubercules après récolte.

### 2.2. Lutte chimique

Pour des raisons de protection de l'environnement, les doses faibles des traitements chimiques des cultures à base de cuivre ou d'organomercure demeurent peu efficaces (Priou and Jouan, 1996). De nouveaux composés capables d'altérer l'intégrité cellulaire bactérienne ou d'inhiber la croissance des *Pectobacterium*, des solutions salées de chlorure d'aluminium et de métabisulfite de sodium (Yaganza et al., 2004) ou encore de peptides de synthèses (Kamysz et al., 2005), se sont avérés très efficaces lors d'essais au laboratoire. Si ces composés peuvent sembler très intéressants grâce à leur large spectre d'hôte (fongique et

bactérien), le risque écologique d'altération des équilibres microbiens apparaît très important (Latour et al., 2008).

### 2.3. Lutte génétique et transgénèse

D'après les études génétiques sur la résistance de la pomme de terre aux maladies (Gebhardt et Valkonen 2001), les quelques régions susceptibles de jouer un rôle dans la résistance à *Pa* semblent éparpillées sur les 12 chromosomes de cette plante. L'amplitude de cette résistance varie en fonction de la variété étudiée. Pasco (2005) montre ainsi que sur un panel de 16 variétés, la variété Kerpondy est peu sensible, tandis que la variété Ackergesegen est très sensible aux pourritures molles engendrées par *Pa*. Cependant, l'obtention par croisement variétal de plants résistant et en même temps, présentant des caractères améliorant le rendement, la conservation, les critères organoleptiques ou la teneur en amidon ou sucres réducteurs est actuellement difficile, car longue et aléatoire (Latour et al., 2008).

Certains généticiens ont proposé la création de variétés transgéniques de pomme de terre, ayant intégrées un ou plusieurs gènes d'origine microbienne, végétale ou animale. L'exemple le plus étudié est la production de lysozyme par la plante transgénique après intégration dans son génome d'un gène originaire d'un bactériophage. Düring et al., (1993) ont montré que le lysozyme pourrait inhiber la multiplication des bactéries et maintiendrait ainsi leur densité en dessous du niveau de virulence. Cependant, son action non spécifique pose un risque environnemental similaire à celui évoqué précédemment pour les composés chimiques à large spectre d'hôte (Latour et al., 2008).

### 2.4. Lutte biologique

La lutte biologique est définie classiquement comme l'utilisation d'agents biologiques (virus, bactéries, champignon, nématodes...), pour lutter contre les organismes pathogènes et les ravageurs des plantes. Cette technique repose essentiellement sur l'exploitation des relations dynamiques entre la plante et son environnement. Différentes approches de base de la lutte biologique ont ainsi été définies : la compétition, le parasitisme, l'antibiose et l'induction des systèmes de défense chez la plante.

- **La compétition** entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance (Neeno-Eckwall et al., 2001).

- **Le parasitisme** ou l'utilisation d'organismes vivants (appelés auxiliaires) pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles. Plus d'une centaine d'espèces d'auxiliaires sont utilisées dans le monde mais la très grande majorité est représentée par des insectes parasitoïdes. Aucun traitement de lutte efficace contre les *Pectobacterium* basé sur ce mécanisme n'est disponible actuellement.

- **L'antibiose** ou l'inhibition d'un microorganisme par le produit métabolique d'un autre est proposé par certains auteurs comme une approche de lutte biologique efficace contre les *Pectobacterium* sp. Baz et al (2012) montrent que l'utilisation des actinomycètes, connues pour produire des substances antibiotiques, inhibe le développement de la pourriture molle de quatre cultivars différents de pomme de terre causé par Pcc et Pa. D'autres microorganismes modèles, appartenant au genre *Pseudomonas*, ont été principalement étudiés au laboratoire en tant que biopesticides potentiels pour leur capacité à former des sidérophores de type pseudobactin ou pyoverdine. Cependant, l'efficacité de ces isolats n'a jamais été démontrée au champ. Cela pourrait être attribué aux différences de caractéristiques biotiques et abiotiques des sols, qui ne permettent pas à ces souches de maintenir dans le temps une population suffisamment élevée pour être efficace (Duffy et al., 2003; Latour et al., 2008).

- **L'inhibition du quorum sensing** : Comme décrit précédemment, le signal de quorum-sensing est désigné comme une cible privilégiée pour développer des outils de lutte contre la virulence de *Pectobacterium*. Ces nouvelles méthodes de lutte n'ont pas vocation à éliminer le pathogène, mais à en atténuer la virulence par interruption de la signalisation quorum-sensing. Ces stratégies d'antivirulence ciblent la perturbation de la perception par les pathogènes des signaux QS et/ou la dégradation de ces derniers (Cirou et al., 2009). En effet, une large gamme de molécules est actuellement décrite comme susceptible d'affecter directement la signalisation quorum-sensing. Les plus étudiées sont les furanones halogénées de synthèse ou issues d'une algue, *Delisea pulchra* (Ponnusamy et al., 2010). Ces molécules, ont généralement pour cible la protéine bactérienne impliquée dans la perception du signal (Latour et al., 2008). Par ailleurs, de nombreuses bactéries de la rhizosphère et du sol sont capables de dégrader les molécules signales du quorum-sensing. Ces bactéries appartiennent à différents groupes bactériens : *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* et *Chryseobacterium*. Tous ces isolats sont capables de dégrader les AHLs synthétiques et naturelles produites par *Pa* (Mahmoudi et al., 2011b).

- **La Stimulation des réponses de défense chez la plante** dépend du type d'interaction moléculaire qui s'établit entre la plante et son agent pathogène. En effet, Au cours de leur évolution, les plantes ont mis en place des réponses de défense efficaces leur permettant une meilleure adaptation à leur environnement (Zhang and Zhou, 2010). Ainsi, la plupart des plantes sont résistantes à la plupart des microorganismes potentiellement pathogènes avec lesquelles elles sont en contact. Elles disposent d'un éventail de défense, allant de barrières morphologiques constitutives à la mise en place de mécanismes cellulaires spécifiques (Tsuda and Katagiri, 2010). La perception de certaines molécules par les cellules végétales peut mener au déclenchement direct des réactions de défense ou mettre la plante en état de veille pendant laquelle elle pourra mobiliser plus rapidement et efficacement ses défenses contre un grand nombre d'agresseurs et pour une période relativement longue (Conrath et al., 2002; Newman et al., 2002). Ce phénomène dit "potentialisation" permet à la cellule de fournir moins d'énergie par rapport à celle nécessaire à l'induction directe des réactions de défense (Conrath et al., 2006).

Différents types de molécules sont considérées comme des stimulateurs des défenses naturelles (SDN). Il s'agit principalement d'oligosaccharides dérivés de parois de champignons, d'algues, de bactéries ou de crustacés (Blanchard and Limache, 2005). Le chitosan par exemple est un chitosaccharide obtenu par déacétylation de la chitine. Les expérimentations au champ ont permis de révéler une efficacité de 40 % contre *Botrytis cinerea* (pourriture grise de la vigne) avec deux applications, avant et après l'attaque du pathogène (Barka et al., 2004). Le chitosan est présent dans la spécialité Elexa<sup>®</sup> développée par GlycoGenesis. Un autre exemple de SDN qui s'insère dans la cascade complexe des signaux de la plante conduisant à mobiliser ses moyens de défense, une harpine. C'est le produit d'un cluster de gènes conservés, les gènes *hrp*, qui induisent différentes réponses de défenses chez les plantes (Reboutier et al., 2007a). La harpine HrpN d'*Erwinia amylovora* est désormais la substance active du Messenger<sup>®</sup> (à 3 %), développé aux Etats-Unis par Eden Bioscience et du Employ<sup>®</sup> développé par la société Plant Health Care. Ces préparations induisent une réponse de la plante dans les 3 à 5 jours après traitement, qui dure plusieurs semaines selon la culture (Blanchard and Limache, 2005).

Le lipopolysaccharide en tant que MAMP est également capable d'activer différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à des réponses de défense. Erbs and Newman, (2012) suggèrent que les effets de LPS dans l'induction des défenses basales et la prévention de

résistance locale permettraient à la plante d'exprimer sa résistance, sans provoquer de sérieux dommages à ses propres structures cellulaires. Par ailleurs, dans certains cas, les LPS permettent, sans déclencher des réactions de défense apparentes, de mettre la plante en état de veille : la plante serait alors capable de déclencher plus rapidement et fortement ses réactions de défense suite à l'attaque ultérieure d'un pathogène (Conrath et al., 2002; Newman et al., 2002). D'autres études ont révélé que les LPS de bactéries pathogènes et en particulier ceux de *Pcc* permettent de protéger partiellement les tubercules de pomme de terre de différents cultivars contre les *Pectobacterium* sp (Val et al., 2006). De fait, la capacité des plantes à reconnaître les LPS et les conséquences de cette reconnaissance dans les interactions plantes-bactéries est un sujet d'intérêt (Dow et al., 2000; Newman et al., 2007, 2010). D'une manière générale, lors d'une interaction plante-microorganisme, différents types de résistances systémiques peuvent être mis en place chez la plante à savoir :

**La résistance systémique acquise (SAR, *systemic acquired resistance*)** qui est une forme de résistance qui s'établit dans toutes les cellules saines de la plante par l'intermédiaire du système vasculaire suite à la perception d'un signal éliciteur (Sticher et al., 1997). Cette résistance a été démontrée pour la première fois par Ross qui a constaté que suite à une première infection de plants de tabac par le TMV (Tobacco Mosaic Virus), une deuxième infection provoquait moins de dégâts au niveau de la plante entière (Ross, 1961). Les plantes semblent donc être capables de mémoriser l'impact d'une première infection afin de se protéger face à une seconde infection. Généralement, ce type de résistance peut durer plusieurs semaines (Hammerschmidt, 2009) et permet la protection de la plante contre une attaque ultérieure par un large spectre de pathogènes (Durrant and Dong, 2004). Le temps nécessaire pour l'établissement de la SAR et le niveau de protection atteint dépendent de la plante et du type d'organisme utilisé pour l'inoculation initiale (Sticher et al., 1997). De plus, une accumulation locale et systémique d'acide salicylique (SA) et une augmentation de l'expression des gènes codant certaines protéines PR (pathogenesis related) sont observées lors de la SAR, participant au maintien de l'état de résistance de la plante (Durrant and Dong, 2004). Toutefois, le SA n'est pas le signal utilisé pour la propagation distale de la résistance (Vernooij et al., 1994). Un certain nombre de travaux réalisés à l'aide de mutants d'*Arabidopsis* placent plusieurs molécules comme candidats pour être des médiateurs de la SAR, parmi lesquelles: la forme méthylée de l'acide salicylique (MeSA), l'acide jasmonique, un petit peptide généré par l'action d'une protéase apoplastique (CDR1, Complementarity

Determining Region 1) et le NO (Vlot et al., 2008). Cependant, des données récentes sur *Arabidopsis* révèlent que l'induction de la SAR est indépendante de la production de MeSA et de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (Attaran et al., 2009). Les données accumulées jusqu'à présent ne permettent pas de conclure sur un candidat précis pour la transmission d'un signal activant la SAR.

**La résistance systémique induite (ISR, *induced systemic resistance*)** qui est aussi une forme de résistance systémique qui confère une meilleure protection de la plante lors d'attaques ultérieures par des pathogènes (Pieterse et al., 1996). Elle est stimulée par certaines rhizobactéries (PGPR, Plant-growth promoting rhizobacteria) ou mycorhizes non-pathogènes. Ces derniers sont capables de réduire la maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Pieterse et al., 2003). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance (Bakker et al., 2007). L'ISR induit une modulation de l'expression de gènes de défenses au niveau des racines (Verhagen et al., 2004). Elle induit également une potentialisation systémique des défenses de la plante, caractérisées lors d'une infection ultérieure par une augmentation de l'expression génique et un dépôt de callose et de pectine au niveau des feuilles (Verhagen et al., 2004). L'ISR est donc phénotypiquement similaire à la SAR. Cependant, elle utilise des voies de signalisation en partie différentes puisqu'elle est régulée par l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), et ne dépend pas du SA (Van der Ent et al., 2009). De plus, les mécanismes de résistance dans l'ISR atteignent leur efficacité maximale entre 4 à 5 jours après l'application d'un agent induisant, mais le niveau de persistance de la résistance diminue avec le temps (Zamioudis and Pieterse, 2012). Généralement, l'ISR ne confère pas une protection totale contre l'infection et la durabilité de la résistance induite par les PGPR diffère d'une plante à l'autre, mais aussi en fonction de la souche bactérienne utilisée (Ramamoorthy et al., 2001).

### 3. Voies de signalisation des réponses de défense

Parmi les mécanismes de résistance de la plante face aux agents pathogènes, il y'a les défenses constitutives de première ligne formées par l'ensemble des barrières physiques de la plante, en particulier la cuticule et la paroi végétale. La cuticule, formée de cutine et de cires, protège la surface des parties aériennes de la plante (Chassot and Metraux, 2005). La paroi pectocellulosique protège quant à elle chaque cellule végétale. Généralement, ces barrières physiques préformées empêchent l'entrée ou la progression de l'agent pathogène dans les tissus de la plante. Cependant, certains micro-organismes parviennent parfois à dépasser ces barrières physiques, en infectant la plante par les ouvertures naturelles (stomates, hydathodes ou blessures), ou encore *via* l'action d'enzymes hydrolytiques permettant la dégradation de la cuticule ou de la paroi cellulaire (Reina-Pinto and Yephremov, 2009).

Lorsque la plante est confrontée à une attaque par un organisme qui dépasse cette première ligne de défense, deux types d'interactions peuvent avoir lieu :

a. Soit la plante est protégée contre l'attaque de l'agresseur et le processus est qualifié d'interaction non-hôte ou incompatible de base. Les plantes, bien qu'elles ne possèdent pas un système immunitaire mobile et adaptatif comme les animaux, ont développé une immunité innée au niveau de leurs cellules qui permet la mise en place d'une résistance de type PTI (*PAMP-triggered immunity*) correspondant à ce qui était précédemment appelé résistance basale et résistance non hôte (Ryan et al., 2007; Sanabria et al., 2008; Tsuda and Katagiri, 2010)

b. Soit la plante est susceptible et peut être infectée par le pathogène virulent. L'interaction est alors dite compatible et la maladie est propagée. Toutefois, il existe un troisième type d'interaction dite incompatible spécifique basée sur le concept « gène-pour-gène » (Flor, 1971). Ce concept met en jeu une reconnaissance très spécifique entre un pathogène avirulent et une plante hôte. Elle fait intervenir deux gènes dominants: un gène du pathogène dit d'avirulence (*Avr*) et un gène de la plante dit de résistance (*R*). Les produits de ces deux gènes vont interagir selon une relation de type récepteur/ligand. La formation de ce complexe va déclencher une cascade d'événements qui conduira à la résistance de la plante le plus souvent grâce à la mise en œuvre de la réponse hypersensible (HR) et la résistance systémique acquise (SAR) (Heath, 2000; Shirasu and Schulze-Lefert, 2000). Il s'agit de la résistance de type ETI



(*effector-triggered immunity*) dite aussi résistance spécifique (Iriti and Faoro, 2007; Dodds and Rathjen, 2010).

De plus des signaux systémiques produits au site d'infection sont capables de migrer dans la plante et induire des événements cellulaires complexes conduisant à une résistance systémique active vis-à-vis des micro-organismes pathogènes (Dangl and Jones, 2001; Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006).

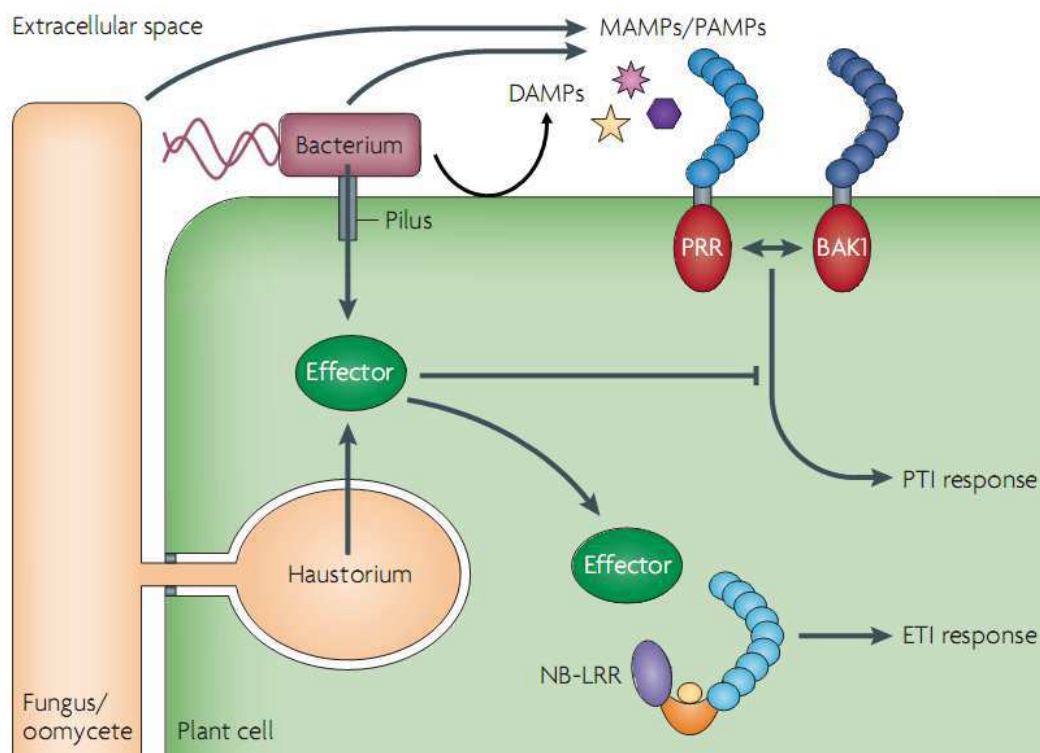
### 3.1. La résistance basale PTI et reconnaissance de l'agent pathogène

La résistance basale, ou PTI, est non spécifique et impliquée lors d'interactions entre un grand nombre de plantes et de pathogènes (Iriti and Faoro, 2007). Elle est déclenchée par la perception d'éliciteurs ou molécules associés aux microorganismes (MAMPs, *microbe-associated molecular patterns*), capables d'induire les réactions de défense chez les plantes. Les MAMPs, appelés aussi PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) sont des molécules conservées chez les microorganismes, absentes chez l'hôte et jouent un rôle important dans la vie microbienne (Zipfel, 2009). Le terme MAMP est préféré puisque des microorganismes non pathogènes possèdent eux aussi de telles molécules. Parmi les MAMPs on compte les lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif (Erbs and Newman, 2012), la flagelline (Albert et al., 2010), le facteur d'élongation (EF-Tu) (Zipfel et al., 2006) ou cold-shock protéines d'eubactéries (Felix and Boller, 2003), les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif (Erbs and Newman, 2012) ou à Gram négatif (Erbs et al., 2008), ou l'ergostérol de champignons (Lochman and Mikes, 2006). En plus de ces éliciteurs de nature chimique variée (peptidique, lipidique et oligosaccharidique), d'autres d'origine végétale appelées DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), issus généralement de la dégradation des parois, peuvent après perception par les systèmes de reconnaissance de la plante, déclencher la voie de signalisation PTI (Boller and Felix, 2009; Heil, 2009).

Les éliciteurs et en particulier les MAMPs sont reconnus par des récepteurs des cellules végétales appelés PRRs (*pattern recognition receptors*) (Zipfel, 2008). Ces récepteurs présentent des similarités de structure avec les récepteurs Toll-like (TLR) exprimés dans les cellules animales (Hayashi et al., 2001). Ils possèdent un domaine LRRs (leucine rich repeats) extracellulaire et sont divisés en trois sous classes : les receptor-like proteins (RLPs), les receptor-like kinases (RLKs) et les polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) (Chisholm et al., 2006). Plusieurs interactions ont pu être établies entre les MAMPs et leurs récepteurs.

Ainsi Flg22, un peptide de 22 acides aminés issu de la flagelline de *Pseudomonas syringae*, reconnue par son récepteur FLS2 (Flagellin-sensitive 2) déclenche des réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana* (Chinchilla et al., 2007). Un autre éliciteur peptidique très étudié est le Pep13, fragment d'une transglutaminase, présent chez une dizaine d'espèces de *Phytophthora*, qui possède des propriétés élicitrices chez le persil et la pomme de terre (Brunner et al., 2002). Bien que la perception des LPS par les récepteurs TLR4 a été largement étudié chez la cellule animale, chez les plantes ce mécanisme de reconnaissance demeure inconnu (Erbs and Newman, 2012) malgré l'hypothèse émise dans de nombreux travaux et selon laquelle le LPS de *Xanthomonas campestris* est reconnu par un récepteur spécifique de la membrane plasmique et pourrait être internaliser à l'intérieur de la cellule végétale par endocytose (Gross et al., 2005; Büttner and Bonas, 2010). Par ailleurs, des peptides endogènes sécrétés par les plantes en cas d'attaque pathogène ont été également capables d'induire des réactions de défense, comme la systémine chez la tomate ou encore le peptide AtPep1 chez *Arabidopsis thaliana* (Boller, 2005; Pearce et al., 2008). Enfin, il apparait que la perception des éliciteurs fait appel à certaines molécules membranaires comme la protéine BAK1 (*brassinosteroid receptor1-associated kinase 1*) ou CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*) pour permettre le déclenchement de la signalisation conduisant aux réponses de défense (Zipfel, 2009; Albrecht et al., 2012).

La PTI constitue alors, un premier niveau de défense. Cependant, certains pathogènes parviennent à contourner la PTI via la production d'effecteurs codés par des gènes d'avirulence (Avr) et injecté via le système de sécrétion de type 3. Un second niveau de défense, l'ETI (effector-triggered immunity) peut alors être mis en place par la plante (figure 10).



**Figure 10. Principes de l'immunité des plantes**, modifié d'après Jones and Dangl (2006) ;Goehre and Robatzek (2008) ;Dodds and Rathjen (2010).

Un grand nombre d'agents pathogènes établissent un contact physique avec les cellules de la plante hôte : Certaines bactéries produisent un système de sécrétion de type III (T3SS) qui forme une seringue moléculaire (pilus) pénétrant à travers la paroi végétale et la membrane plasmique pour injecter des molécules appelées effecteurs dans le cytoplasme. Certains champignons et oomycètes peuvent pénétrer dans les cellules de l'épiderme en formant des appressoria; ces structures permettent la pénétration de l'hyphe à travers la paroi végétale. Par la suite, des structures nourricières appelées haustoria peuvent être formées, entourées par la membrane plasmique de la plante. Des molécules d'origine diverses (MAMPs, PAMPs ou DAMPs) libérées dans les espaces extracellulaires, sont reconnues par les récepteurs de surface cellulaires (PRR, *patterns recognition receptors*). Ces derniers sont généralement constitués d'un domaine extracellulaire, riche en leucine (LRR, bleu), et d'un domaine kinase intracellulaire (rouge). Les PRR initient la voie de signalisation PTI en interagissant avec les protéines BAK1 (*brassinosteroid associated kinase 1*). Les effecteurs intracellulaires, quant à eux, sont reconnus par des récepteurs intracellulaires de type NB-LRR (nucleotide binding-leucine rich repeat) constitués d'un domaine carboxy-terminal LRR. (bleu clair), d'un domaine central NB (orange) qui fixe l'ATP ou l'ADP (jaune) et d'une protéine TIR (amino-terminal Toll, interleukin-1 receptor,) ou CC (coiled-coil, violet). Les effecteurs agissent généralement pour réprimer la voie PTI et induire l'ETI.

### 3.2. La résistance ETI et reconnaissance de l'agent pathogène

Cette résistance spécifique est génétiquement contrôlée par des gènes de résistance *R* chez la plante et des gènes d'avirulence *Avr* chez le pathogène. Selon le concept gène pour gène, toute perte ou altération de l'un de ces deux gènes conduit à la maladie (compatibilité). Au contraire, la reconnaissance du produit du gène *Avr* par la protéine *R* initie une cascade d'événements cellulaires conduisant à la résistance (Jones and Dangl, 2006). Plusieurs récepteurs intracellulaires de type NB-LRR (nucleotide binding-leucine rich repeat) ont été décrits pour définir la nature directe ou indirecte de l'interaction, entre la protéine *R* et la protéine *Avr*. Dans l'interaction directe, la protéine *R* interagit physiquement avec l'effecteur du pathogène. C'est le cas de l'interaction entre l'effecteur AvrPto de *Pseudomonas syringae* avec la protéine Pto chez la tomate (Tang et al., 2006). Dans de nombreux autres pathosystèmes, il a été proposé que la reconnaissance de l'effecteur se fasse de manière indirecte (DeYoung and Innes, 2006). Un nouveau modèle a donc été proposé, impliquant l'intervention d'une troisième composante dans cette interaction (Bergelson et al. 2001 ; van der Hoorn et al. 2002). Dans ce dernier modèle, appelé «hypothèse de garde», la protéine *Avr* ne serait pas la cible directe de la protéine *R* mais ferait partie d'un complexe incluant une protéine de garde médiant l'interaction. Il est important de noter également que la structure de la plupart des protéines *R* identifiées à ce jour possède un domaine N-terminal coiled-coiled (CC) ou Toll-interleukin-1 récepteur (TIR) mais il existe des protéines *R* avec des domaines différents (Tameling and Takken, 2008). Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte environ 600 protéines RLK (Shiu et al., 2004), 57 RLP (Wang et al., 2008) et plus de 149 NB-LRR (Belkhadir et al., 2004).

Cette forme de résistance conduit à une réaction qui culmine souvent en réponse hypersensible (HR) suite à la production rapide de formes actives d'oxygène (ROS, NO). Ces dernières peuvent avoir un effet antimicrobien direct, et servir de signal pour d'autres réactions de défense (Lamb and Dixon, 1997). De plus, La HR ne s'étend pas au-delà des cellules infectées au niveau desquelles elle retarde la croissance du pathogène. Enfin, la résistance *R/Avr* est plus rapide que la reconnaissance des MAMPs. Elle est associée également à des dépôts de callose, à l'expression de protéines PR et à l'induction de la SAR (Van Loon et al., 2006). Des événements de signalisation peuvent être communs à la PTI et à l'ETI (Tsuda and Katagiri, 2010) comme décrits dans de nombreux pathosystèmes (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Garcia-Brugger et al., 2006; Stergiopoulos and de Wit, 2009).

### 3.3. Transduction du signal et signalisation précoce

Suite à la reconnaissance du signal éliciteur (PAMPs, DAMPs ou effecteurs), différentes voies de signalisation peuvent être activées au niveau cellulaire. Ces voies de signalisation impliquent différents événements précoces conduisant aux réponses plus tardives. Ces événements rapidement activés comprennent la modulation de flux d'ions à travers la membrane plasmique, notamment des influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et des efflux de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  ou encore  $\text{K}^+$ . Ces mouvements d'ions déclenchent une dépolarisation membranaire, dont l'amplitude et la durée dépendent du signal éliciteur (Garcia-Brugger et al., 2006). Ces flux d'ions peuvent agir en amont d'autres événements de signalisation incluant l'activation des modules MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et des CDPK ( *$\text{Ca}^{2+}$ -dependant protein kinases*) responsables de processus de phosphorylation/déphosphorylation (Rodriguez et al., 2010), ou encore la production précoce de formes actives de l'oxygène (ROS) et de monoxyde d'azote (NO) (Lamotte et al., 2006). Ces derniers, limitent le développement du pathogène de façon directe grâce à leur toxicité et participe au renforcement des parois cellulaires de la plante (Faulkner and Maule, 2011). Ces événements sont fréquemment impliquées dans l'induction de réponses plus tardives comme l'induction de gènes de défenses et à la mise en place de la HR (Lamb and Dixon, 1997).

### 3.3.1. Modifications des flux ioniques

Les modifications des flux d'ions à travers la membrane plasmique (notamment par ouverture ou fermeture de canaux ioniques) se déclenchent généralement très rapidement, de quelques secondes à quelques minutes, après la perception d'un signal éliciteur (Bouteau and Tran, 2012). Différentes études ont montrées que les efflux des anions et de  $K^+$ , étaient régulés chez les plantes lors des interactions avec des pathogènes ou des molécules dérivées des pathogènes, PAMPs ou phytotoxines (Reboutier et al., 2007a; Errakhi et al., 2008b). L'activation des efflux d'anions a en particulier été décrite comme un évènement précoce induit lors de l'induction de l'immunité innée chez les plantes (Garcia-Brugger et al., 2006). Le rôle de ces efflux d'anions dans l'induction des mécanismes de défense n'est pas toujours bien défini. Certaines études suggèrent une corrélation entre des efflux d'anions et l'établissement de réactions de défense. La plupart de ces études a portée sur la HR ou la mort cellulaire associée suite à une infection par un pathogène ou le traitement par des éliciteurs purifiés, comme les harpines (Qiu et al., 1999; Reboutier et al., 2007b), les oligogalacturonides (Cessna and Low, 2001), la thaxtamine (Errakhi et al., 2008b), l'acide oxalique (Errakhi et al., 2008a) ou la cryptogéine (Wendehenne et al., 2002). Ces études indiquent que ces canaux anioniques jouent un rôle essentiel dans la signalisation comme la stimulation du métabolisme oxydatif, la variation du calcium cytosolique, l'activation des MAPK, et l'activation transcriptionnelle de gènes de défense (Cessna and Low, 2001; Wendehenne et al., 2002; Gauthier et al., 2007; Errakhi et al., 2008a). D'autres études rapportent l'activation de l'efflux de  $K^+$  en réponse à certains éliciteurs (Blatt et al., 1999; El-Maarouf et al., 2001; Reboutier et al., 2007a; Haapalainen et al., 2012). Chez *Erwinia amylovora*, la harpine N induit une activation des courants  $K^+$  permettant un efflux de  $K^+$  et une production de ROS sur culture cellulaire d'*Arabidopsis* (Reboutier et al., 2007a) et de tabac (Pike et al., 1998; El-Maarouf et al., 2001).

- *Rôle des canaux ioniques en réponse aux LPS*

Peu d'études ont portés sur la régulation des flux d'ions chez les plantes en réponse aux LPS. Ali et al (2007) montre qu'un influx du calcium via le canal CNGC2 est un évènement précoce nécessaire pour la production du NO qui pourrait être impliqué dans la mort cellulaire. De plus, un efflux de  $K^+$  dans le milieu extracellulaire en réponse aux LPS de *Sinorhizobium meliloti* a été révélé dans les travaux de Albus et al. (2001).

### 3.3.2. Modifications de pH extracellulaire

Les modifications de pH extracellulaire est l'une des réactions de défense largement étudié chez les plantes. Elles jouent un rôle crucial dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques. Felle (2001) définit ces modifications de pH comme un signal nécessaire aux processus physiologiques déclenchés lors de la perception d'un signal éliciteur par la plante. Il les définit également comme un messager de la signalisation cellulaire. Des informations concernant les flux de protons  $H^+$  à travers la membrane plasmique peuvent être déduites des études menées sur les modifications de pH du milieu cellulaire.

La première réaction observée suite à une élicitation par le LPS dans une interaction incompatible est un efflux d'ions  $H^+$ , résultant de l'alcalinisation extracellulaire du milieu (Desender et al., 2006). Cet efflux cytoplasmique de  $H^+$  dans le milieu extracellulaire induit par le LPS de *Sinorhizobium meliloti* (Albus et al., 2001) ou le LPS<sub>B.cep.</sub> ou encore par l'extrait de levure (YE) (Gerber et al., 2004) a été observée chez des cultures cellulaires de tabac. En revanche, une acidification importante du milieu extracellulaire des cellules de tabac a été détectée dans les deux types d'interactions plante/éliciteur. Lors d'une interaction incompatible avec le LPS de *Pectobacterium atrosepticum* (LPS<sub>Pa</sub>) et lors d'une interaction compatible avec le LPS de *Pseudomonas corrugata* (Desender et al., 2007). Il est intéressant de noter que chez les cellules en suspension de pomme de terre, les faibles doses de LPS<sub>Pa</sub> ainsi que d'autres éliciteurs (HrpN, laminarine, et le jus de culture concentré de *Phytophthora infestans*) ne semblent pourtant induire aucune variation du pH cytosolique. Par contre, une acidification du milieu extracellulaire induite par le LPS<sub>Pa</sub> est observée lorsque les cellules sont prétraitées par ces divers éliciteurs (Val et al., 2008). Ceci suggère qu'un éliciteur pourrait jouer également un rôle dans la potentialisation (priming) des réponses de défense chez la plante (Newman et al., 2007; Val et al., 2008).

### 3.3.3. Rôle du Calcium dans la signalisation cellulaire

Au-delà de son rôle, dans la nutrition des plantes et de son implication dans la structure de la paroi de la cellule végétale, le calcium est connu pour être au cœur d'un réseau de voies de signalisation sophistiquées (Hashimoto and Kudla, 2011). La cellule maintient le calcium à un taux faible dans le cytosol (100-200 nM), en le rejetant à l'extérieur ou en le stockant dans divers compartiments cellulaires tel que la paroi, le réticulum endoplasmique et la vacuole, qui constituent des réservoirs cellulaires importants de calcium avec des concentrations de

l'ordre du millimolaire (McAinsh and Pittman, 2009; Reddy et al., 2011). Un fort gradient de concentration est donc maintenu entre le cytosol/extérieur et le cytosol/compartiments cellulaires. Il est maintenant bien établi que la perception par la plante de stimuli d'origine biotique ou abiotique conduit à des variations de la concentration en calcium libre végétales. De plus, la remobilisation rapide du calcium à partir des lieux de stockage observée suite à la perception de divers stimuli et les corrélations étroites entre les influx de calcium et diverses réponses biologiques, démontrent le rôle du calcium en tant que vecteur d'information (second messenger). Ces variations souvent sous forme d'oscillations répétitives ou de pic de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre du cytoplasme ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) sont une caractéristique spécifique d'un stimulus donnée et elles sont désignées par le concept de « signatures calciques » (Webb et al., 1996). Plusieurs études ont montrées que les caractéristiques spatiales et temporelles du signal calcium contribuent à l'établissement de réponses adaptées à la nature du stimulus (Kaplan et al., 2006). Ces signatures pouvant être décodée par une variété de protéines spécifiques (calcioprotéines) susceptibles de détecter ces variations dans différents compartiments cellulaires et de les traduire en réponses biologiques (Reddy, 2001).

Lors d'une perception d'un signal éliciteur par la cellule végétale, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  varie transitoirement. Cette variation peut être due à une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  apoplasmique, via l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique, ou à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves cellulaires internes (Knight et al., 1996). L'utilisation de chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que d'inhibiteurs de canaux calciques de la membrane plasmique a permis d'expliquer l'origine des influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de démontrer que ces influx sont nécessaires à l'activation de multiples réponses induites par les éliciteurs. Les réponses classiquement associées à ces variation calciques sont : la production de ROS (Pugin et al., 1997) l'activation de MAPK (Lebrun-Garcia et al., 1998), l'alcalinisation du milieu extracellulaire (Reboutier et al., 2007a), l'activation de gènes de défense (Van Haasteren et al., 1999) et l'induction d'une HR (Nemchinov et al., 2008).

Des réponses induites par divers éliciteurs tel que : la cryptogéine, la laminarine et les oligogalacturonides ont été observé chez le tabac (Lecourieux et al., 2006). D'autres signatures calciques nécessaire à une série de réponses précoces ou tardives induites par HrpN<sub>ea</sub> d'*Erwinia amylovora* et HrpZ<sub>pss</sub> de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ont été aussi enregistré chez le tabac et le persil (Cessna and Low, 2001). En revanche, aucune variation du  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  n'a été observé chez *Arabidopsis thaliana* par ces éliciteurs (Reboutier et al., 2007a).



Ce qui explique la complexité des signaux induits et confirme l'hypothèse de la signature calcique en tant que support d'information spécifique au stimulus initial et à la nature de la cellule hôte (McAinsh and Pittman, 2009).

- *Variation calcique en réponse aux LPS*

Les réponses de défenses cellulaires activées par les LPS impliquent fréquemment un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux calciques de la membrane plasmique (Ali et al., 2007; Ma et al., 2009). Ainsi, Meyer et al., 2001 ont montré que l'ajout de LPS de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ( $\text{LPS}_{\text{Xcc}}$ ) aux cellules en suspension de tabac induit une réponse calcique biphasique de longue durée. Une réponse dont le premier pic correspond à l'influx de calcium extracellulaire et le second à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les organites de réserve dans le cytosol. Gerber et al. (2004) ont observé un résultat similaire, plus rapide et transitoire en utilisant des LPS de *burkholderia cepacia* ( $\text{LPS}_{\text{B.cep}}$ ). En outre, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  par les LPS déclenche des événements de signalisation qui incluent la phosphorylation des protéine-calcium dépendant nécessaire à la stimulation du métabolisme oxydatif (Gerber et al., 2004). Cependant, le Lipide A seul est incapable d'induire des variations calciques et par conséquent la production des ROS chez les cellules en suspension de tabac (Braun et al., 2005).

Les fonctions du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la transduction du signal provoquée par les LPS sont multiples. L'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  observé pendant les premières minutes suivant le traitement par le  $\text{LPS}_{\text{B.cep}}$  et qui peut être supprimé par un inhibiteur des canaux calciques de la membrane plasmique (le lanthane,  $\text{La}^{3+}$ ), n'est pas nécessaire à la production de ROS (Cessna and Low, 2001; Gerber et al., 2004). Seule la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par les organites de réserve est suffisante pour déclencher la phosphorylation des MAPK et la stimulation du métabolisme oxydatif (Gerber et al., 2004; Gerber and Dubery, 2004).

### 3.3.4. Phosphorylation et déphosphorylation de protéines

Les processus de phosphorylation et déphosphorylation de protéines sont des mécanismes complexes de premier ordre impliqués dans la transduction des signaux chez les plantes (Bartels et al., 2010; Schulze, 2010; Sinha et al., 2011). Les kinases et les phosphatases constituent des éléments clés dans les mécanismes de signalisation en réponses à un signal éliciteur (Gerber et al., 2008). Les approches pharmacologiques utilisant des inhibiteurs de l'activité des protéines kinases ont été les premières études ayant montré le rôle clef que joue

ces protéines dans les voies de signalisation conduisant à la mise en place des réactions de défense (Schulze, 2010).

L'une des réponses de phosphorylation la plus largement documentée est l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) par phosphorylation en réponse un signal éliciteurs. Dans les cellules eucaryotes, les cascades d'activation des modules MAPK sont très conservées et tiennent une place importante dans le système de transduction du signal. Leur importance pour les plantes est également bien connue (Jonak et al., 2002; Baier et al., 2005). Les modules MAP Kinase (MAPK), œuvrent généralement en cascade de trois protéines kinases: la MAP kinase, protéine terminale de la cascade, est phosphorylée par la MAP kinase kinase (MAPKK), elle-même phosphorylée par une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK).

L'implication de la phosphorylation des protéines dans les mécanismes de défense a été mise en évidence dans de nombreux travaux : ainsi, une induction rapide de la phosphorylation des protéines a été observé dans des cultures cellulaires de tomate traitées avec une protéine d'avirulence Avr4 de *Cladosporium fulvum* (Stulemeijer et al., 2007), ou encore chez *Arabidopsis thaliana* traités avec HrpZ de *Pseudomonas syringae* (Lin et al., 2011) ou chez le tabac traité avec la cryptogéine de *Phytophthora cryptogea* (Dahan et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que les inhibiteurs de protéines kinases (tel que la K252a et la Staurosporine) bloquent les réactions de défenses telles que l'alcalinisation extracellulaire (Felix et al., 1993), les flux d'ions (Sokolovski et al., 2005; Hashimoto and Kudla, 2011) la production de ROS (Chen et al., 2009), l'activation de gène de défense (Yang et al., 2001) et la HR (Lin et al., 2011). Il a été montré également que l'expression de certaines MAPK augmente la résistance des plantes aux pathogènes (Asai et al., 2002).

- *Rôle des kinases en réponse au LPS*

Les cascades de signalisation activées par les LPS nécessitent des phosphorylations de protéines. En effet, le staurosporine, un inhibiteur des protéines kinase est capable d'inhiber la production de ROS et l'alcalinisation extracellulaire des cellules en suspension de tabac en réponse aux LPS<sub>B,cep</sub> (Gerber and Dubery, 2004). Il a été montré également que le LPS<sub>B,cep</sub> induit une phosphorylation rapide et transitoire des protéines kinases chez *Arabidopsis* et le tabac (Piater et al., 2004; Milena, 2005). Les protéines kinases activées en réponse aux LPS possèdent des caractéristiques des MAPK (Gerber and Dubery, 2004; Gerber et al., 2006):

elles ont un poids moléculaire proche de celui décrit pour les MAPK (de 40 à 50 kDa), elles phosphorylent la protéine ERK-like (extracellular signal-regulated kinase-like), un substrat classique des MAPK, et sont phosphorylées sur des tyrosines comme les MAPK (Piater et al., 2004; Milena, 2005). Une étude récente révèle que la perception et la transduction du signal d'élicitation induit par les LPS<sub>B.cep</sub> nécessite un équilibre complexe entre les actions de certaines protéines kinases et phosphatases (Gerber et al., 2008).

### 3.3.5. Production d'espèces réactives de l'oxygène ou "burst" oxydatif

Lors de la vie de la plante, différentes espèces réactives d'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) sont produites (tableau 4).

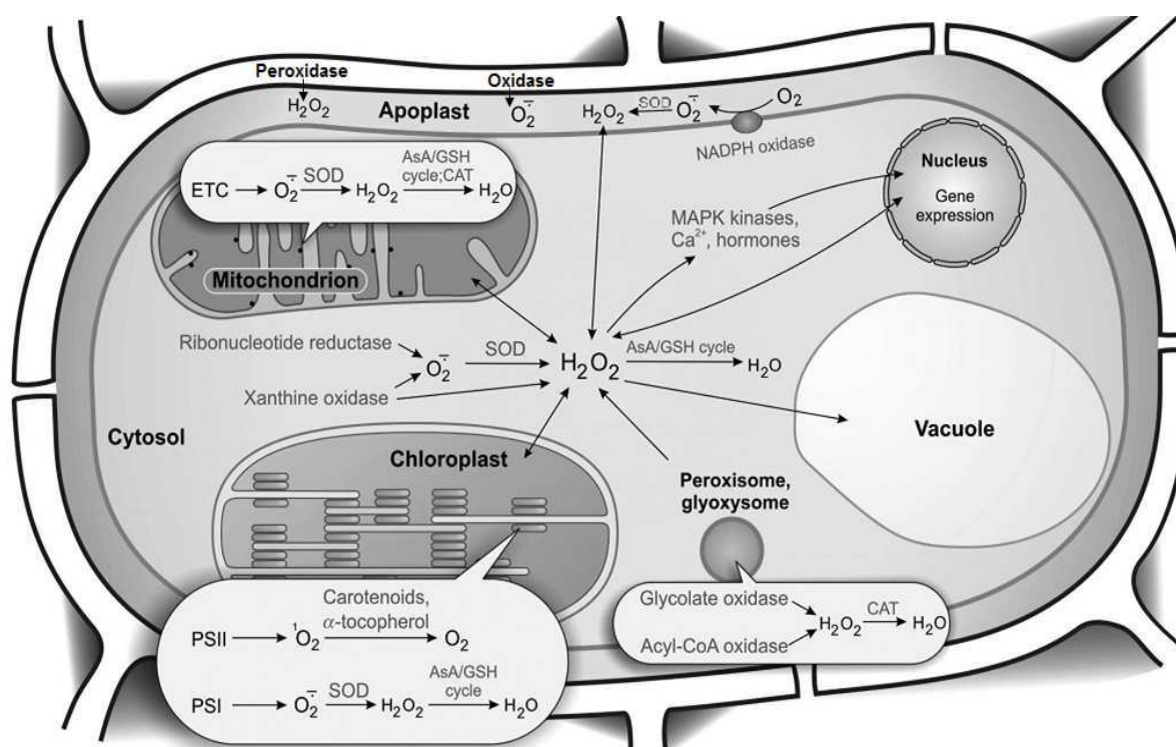
**Tableau 4.** Principaux espèces réactives de l'oxygène produites par la cellule végétale, d'après Noctor & Foyer, (1998) ; Vranová et al. (2002) ; Moreau et al. (2010).

Radicaux (nomenclature)	libres	Structure chimique	Temps $\frac{1}{2}$ vie (sec.)	Toxicité
Radical hydroxyle		HO <sup>•</sup>	10 <sup>-9</sup>	+++
Radical alkoxy		RO <sup>•</sup>	10 <sup>-6</sup>	++
Radical hydroperoxyde		HOO <sup>•</sup>	10 <sup>-9</sup>	+++
Radical peroxyde		ROO <sup>•</sup>	10 <sup>-6</sup>	++
Radical oxyde nitrique		NO <sup>•</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-3</sup>	++
Peroxyde d'hydrogène*		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-2</sup>	+
Radical dioxyde d'azote		NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	10 <sup>-3</sup>	+
Peroxynitrite		ONOO <sup>•</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-3</sup>	++
Anion superoxyde		O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	10 <sup>-6</sup>	+
Oxygène singulet		<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-9</sup>	++

\* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.

Les plantes utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes (Gardès-Albert et al., 2003). Cependant, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne inévitablement d'une production de radicaux oxygénés, hautement réactifs et toxiques. Ces radicaux peuvent être produits de façon continue dans différents compartiments de la cellule (chloroplastes, mitochondries ou peroxysomes), en tant que sous-produits du métabolisme cellulaire (Gill and Tuteja, 2010). Les ROS sont donc produits en permanence et résultent des sous-produits métaboliques de diverses voies localisées dans différents compartiments cellulaires (Noctor and Foyer, 1998).

Un "burst" oxydatif est observée suite à l'agression de la plante par un agent pathogène ou en réponse rapide et transitoire à un éliciteur (Torres et al., 2006). La majorité des ROS serait produite par une NADPH-oxydase de la membrane plasmique qui catalyse la réduction de l' $O_2$  en  $O_2^{\bullet-}$  en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est ensuite rapidement transformé en  $H_2O_2$  par une superoxyde dismutase (SOD) (figure 11). L'utilisation d'inhibiteurs de NADPH oxydases tel que le diphényliodonium (DPI), permet de bloquer le burst oxydatif après élicitation dans différents systèmes végétaux (Levine et al., 1994; Jabs et al., 1997; Jiang and Zhang, 2003). Chez *Arabidopsis*, trois groupes de gènes codant des NADPH-oxydases ont été distingués selon l'expression des transcrits dans la plante, ceux présents dans toute la plante (*Atrboh D* et *F*), dans les racines (*Atrboh A*, *B*, *C*, *E*, *G* et *I*), et dans le pollen (*Atrboh H* et *J*). Ces enzymes seraient impliquées dans l'activation de réponses de défense chez la plante (Sagi and Fluhr, 2006; Gyan'ko and Ischenko, 2010).



**Figure 11.** Origine et devenir métabolique des ROS produits par les différents compartiments de la cellule végétale, modifié d'après (Gadjev et al., 2008)

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; ETC, electron transport chain; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; AsA/ GSH, ascorbic acid/glutathione.

Du fait de leur forte réactivité et toxicité, les ROS sont prises en charge par différents systèmes antioxydants. Parmi ceux-ci il y a des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) des molécules antioxydantes naturellement produites par l'organisme (Acide ascorbique, les protéines plasmatiques et la glutathion ; GSH) et des antioxydants exogènes tel que les polyphénols (Zabłocka and Janusz, 2008). Plusieurs sondes chimioluminescentes de spécificité variable ont été mises au point pour la détection des ROS : un analogue de la luciférine de Cypridina, CLA (Zhou et al., 2006) ; le luminol (Rost et al., 1998) ou encore le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H<sub>2</sub>DCFDA (Setsukinai et al., 2003).

Le rôle des ROS dans les réactions de défense est multiple mais n'est pas totalement élucidé. Les ROS sont proposés avoir une double fonction : effet antimicrobien direct ou activation de voies de signalisation (Martin and Barrett, 2002). Ceci dépend de l'équilibre délicat entre la production de ROS et la détoxification au niveau spatial et temporel (Gratao et al., 2005). Il est reconnu que leur production, liée aux métabolismes respiratoire et photosynthétique, joue un rôle essentiel dans la vie et la mort de la cellule végétale (Gratao et al., 2005). En effet, elles peuvent agir comme des molécules de la signalisation cellulaire pour mettre en place des mécanismes de défense tel que la production de phytoalexines (Jabs et al., 1997) ou l'activation de gènes de défenses (Desikan et al., 1998) vis-à-vis d'un stress, qu'il soit d'origine biotique ou abiotique (Vranova et al., 2002).

- *La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en réponses au LPS.*

Les LPS ont la capacité d'induire une production de ROS chez des cellules végétales non hôte. Ainsi, le LPS de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (LPS<sub>Xcc</sub>) induit un burst oxydatif chez des cultures cellulaires de tabac caractérisé par une lente accumulation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Meyer et al., 2001). De même chez le riz (Desaki et al., 2006), le LPS de bactéries pathogènes de plantes ou non pathogènes induit la production de ROS et participe dans l'expression des réactions de défense. Le LPS de *Burkholderia cepacia* (LPS<sub>B.cep</sub>) est aussi impliqué dans l'induction de ROS et la production de NO chez les cellules de tabac (Gerber et al., 2004).

La génération de ROS peut être accompagnées de différents autres événements classiques associés aux réactions de défense tel que les modifications des flux d'ions (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>), la phosphorylation des protéines et l'alcalinisation du milieu extracellulaire (Gerber and Dubery,

2004; Gerber et al., 2008). D'autres travaux montrent que la production de ROS et de NO en réponse aux différents LPS de bactéries non pathogènes, phytopathogènes ou pathogènes d'animaux (LPS<sub>B.cep</sub>, LPS<sub>Pcc</sub>, LPS<sub>Pa</sub> et LPS<sub>Pseudomonas</sub>) induit l'expression des gènes PR chez *Arabidopsis thaliana* (Zeidler et al., 2004; Livaja et al., 2008).

Par ailleurs, et dans trois modèles végétaux de la famille des solanacées, le LPS de *Pectobacterium atrosepticum* (LPS<sub>Pa</sub>) et de *Pseudomonas corrugata* (LPS<sub>Psc</sub>) n'induisent aucune production de ROS mais acidifient le milieu extracellulaire. Ce qui suggère que les ROS ne seraient pas impliqués dans les variations du pH (Desender et al., 2006).

### 3.3.6. Production du monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est une petite molécule diatomique impliquée dans les réactions immunitaire chez les animaux et dans les réactions de défense chez les plantes (Gupta et al., 2000; Lamotte et al., 2004). Il est reconnu que le NO joue un rôle clef dans certains processus physiologiques chez les plantes en tant que molécule de signalisation (Wilson et al., 2008; Palavan-Unsal and Arisan, 2009). Elle jouerait notamment un rôle clef dans les interactions plantes/pathogènes en activant des gènes de défense et en induisant une HR, tout particulièrement lorsqu'il est associé à la production de ROS (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). Plusieurs voies de biosynthèse peuvent expliquer la production de NO. Cependant, de nombreuses études montrent que la synthèse de NO, observée en réponse à des microorganismes pathogènes ou à des éliciteurs de réaction de défense, est catalysée par deux principales enzymes ; la nitrate réductase et la NO synthase (NOS) (Guo et al., 2003). *AtNOS1* chez *A. thaliana* oxyde la L-arginin en NO et L-citrulline (Wendehenne et al., 2004). Ainsi, le mutant *Atnos1* endommagé dans l'expression de *AtNOS1*, montre une réduction de croissance, de fertilité et une vulnérabilité à l'infection par *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Zeidler et al., 2004). De plus, Guo et Grawford (2005) ont montré que *AtNOS1* est localisé dans les mitochondries et protège les plantes contre la sénescence induite par l'obscurité en réduisant l'accumulation des ROS ainsi que l'oxydation des lipides et des protéines. Ces résultats montrent bien que le NO intervient dans divers processus physiologiques chez les plantes

Il a été montré également que le NO stimule l'activation des gènes de défense tels que la PAL (Phénylalanine ammonia-lyase) principale enzyme de la voie des phénylpropanoïdes, les protéines PRs et plusieurs gènes codant des protéines du métabolisme secondaire impliquées

dans la synthèse de composés antimicrobiens (Klessig et al., 2000; Wendehenne et al., 2004). L'accumulation des ARNm de la PAL en réponse au NO, suggère que le NO permettrait la synthèse de phytoalexines (Durner et al., 1998).

Enfin, la HR observée sur des feuilles d'*A. thaliana* en réponse à la bactérie avirulente *P. syringae* pv. *maculicola* est retardée par l'application d'inhibiteurs de NOS (Delledonne et al., 1998). Cependant, les études faites sur l'implication du NO dans la HR chez *A. thaliana* (Zhang et al., 2003) et *Avena sativa* (Tada et al., 2004) ont montré qu'il ne constitue pas un médiateur essentiel dans cette réaction de défense. D'après Delledonne et al. (2001), le développement de la HR résulterait de l'action concertée entre NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et serait activée lorsqu'un rapport précis entre NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est atteint.

- *Le monoxyde d'azote (NO) en réponse au LPS*

Le Lipopolysaccharide est connu pour être capable d'induire la synthèse de NO lors du déclenchement des réponses de défense impliquées dans les interactions plante-pathogène (Zeidler et al., 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, la production du NO est induite par le LPS de diverses bactéries. Cet effet commun des LPS, suggère l'implication du lipide A comme déterminant moléculaire commun (Zeidler et al., 2004). Dans ces expériences, le LPS a également activé, via le NO, l'accumulation des transcrits de gènes liés à la défense, notamment les gènes PRs (Zeidler et al., 2004; Erbs and Newman, 2012). D'autres travaux (Ali et al., 2007) montrent que l'induction du NO par le LPS passe par une augmentation de calcium cytosolique qui fait intervenir le canal CNGC2 chez *Arabidopsis thaliana*. Récemment, Murakami et al (2011) montrent aussi que LPS de *Mesorhizobium loti* (LPS<sub>M.loti</sub>), reconnu par la plante hôte, provoque la production du NO dans les racines de *Lotus japonicus*.

### 3.3.7. Induction des gènes de défense

Les réponses des plantes à l'attaque par des micro-organismes ou leurs éliciteurs sont complexes, et comportent l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines diverses, dont beaucoup peuvent avoir un rôle dans la mise en place de l'état de résistance de la plante (Van Loon et al., 2006). Parmi ces gènes, ceux codant les protéines PR (pathogenesis related, Tableau 1) sont fortement et classiquement exprimés lors des réactions de défense.

**Tableau 5.** Différents types de protéines PR d'après (Van Loon et al., 2006)

Protéines PR	Activité enzymatique	Cible chez les pathogènes
PR-1	Inconnue	Inconnue
PR-2	$\beta$ -1,3- glucanase	$\beta$ -1,3-glucanes de la paroi
PR-3	Chitinase de type I, II, IV, V, VI et VII	Chitine de la paroi
PR-4	Chitinase de type I, II	Chitine de la paroi
PR-5	Thaumatine-like ou osmotine	Membrane cytoplasmique
PR-6	Inhibiteur de protéinase	Protéinase
PR-7	Endoprotéinase	Inconnue
PR-8	Chitinase de type III	Chitine de la paroi
PR-9	Peroxydase	Inconnue
PR-10	Ribonuclease-like	Inconnue
PR-11	Chitinase de type I	Chitine de la paroi
PR-12	Défensine	Inconnue
PR-13	Thionine	Inconnue
PR-14	Protéine de transfert de lipides	Inconnue
PR-15	Oxalate oxydase	Membrane cytoplasmique
PR-16	Oxalate oxydase-like	Membrane cytoplasmique
PR-17	Inconnue	Inconnue

Les protéines PR constituent un grand groupe de protéines de petite taille, très stables en milieu acide et souvent sécrétées dans l'espace extracellulaire dans la plante. Elles sont produites en réponse à de nombreux pathogènes chez un grand nombre d'espèces végétales comme la tomate, le tabac, le persil, ou encore *A. thaliana*. L'expression des gènes correspondants, notamment lors des réactions de type HR et SAR, est généralement sous le contrôle des phytohormones SA, JA et/ou ET (Van Loon et al., 2006; Mishina and Zeier, 2007). Même si ces protéines PR sont synthétisées en réponse à l'agression par un agent pathogène, il est important de prendre en compte qu'elles sont également synthétisées lors de divers stress biotiques et abiotiques voire même lors du développement des plantes (Van Loon et al., 2006). Van Loon et al., (2006), ont classé les protéines PR en 17 familles selon leurs propriétés biochimiques et moléculaires (tableau 5). Ces protéines ne s'accumulent pas seulement localement dans le secteur infecté mais sont également induites systémiquement (Van Loon et Van Strien 1999).

Les fonctions de ces protéines n'ont pas encore été totalement identifiées (PR1 et PR17), néanmoins, certaines d'entre elle auraient des activités antimicrobiennes et agissent au travers d'activités hydrolytiques, se traduisant par la dégradation de la paroi du pathogène ou par une toxicité vis-à-vis du pathogène. C'est le cas des  $\beta$  1-3 glucanases (PR-2), des chitinases (PR-



3, -4, -8 et -11), des endoprotéases (PR-7), ou encore des défensines (PR-12), thionines (PR-13) et de certaines protéines de transfert de lipides (PR-14). Certaines ciblent préférentiellement les oomycètes, comme PR-1, dont la fonction reste inconnue, ou les *thaumatin-like* protéines (PR-5); d'autres ciblent les virus, comme certaines *ribonuclease-like* protéines (PR-10). La classe 6 regroupe les inhibiteurs de protéases et ciblerait les nématodes et les insectes herbivores. Enfin, certaines possèdent des activités superoxyde dismutase, comme les classes 15 et 16, permettant la génération d' $H_2O_2$ , qui suivant le contexte physiologique peut s'avérer toxique ou jouer un rôle de signalisation. Les peroxydases (PR-9) seraient quant à elles impliquées dans le renforcement de la paroi végétale (Van Loon *et al.* 2006).

En plus de ces protéines PR, d'autres produits de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires sont synthétisés tel que : les inhibiteurs de polygalacturonases, PGIP (De Lorenzo *et al.*, 2001), les lipoxygénases, LOX (Feussner and Wasternack, 2002), les phénylalanine ammonia-lyases, PAL (FukasawaAkada *et al.*, 1996), les protéines riches en glycine (Sachetto-Martins *et al.*, 2000) et également des produits d'autres gènes sont sécrétés en réponse à l'attaque de la plante par des micro-organismes ou leurs éliciteurs. La plupart de ces enzymes interviennent dans le métabolisme secondaire et vont conduire à la production de différentes molécules qui, à leur tour, vont être impliqués dans les défenses de la plante. Ces molécules, appelées phytoalexines, comprennent des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des phénylpropanoïdes, des tanins, des coumarines, des terpénoïdes ou encore des dérivés indoles (Dixon, 2001). Les phytoalexines s'accumulent rapidement autour du site d'infection lors d'interactions incompatibles ou en réponse à des éliciteurs et permettent à la plante, grâce à leur effet toxique, de se défendre contre les agents pathogènes (Burse *et al.*, 2004).

- *Induction des gènes de défenses en réponse au LPS*

Les LPS possèdent la capacité d'induire les résistances basales chez de nombreuses espèces végétales. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, le traitement par le LPS<sub>B.cep</sub> induit l'activation de la transcription de 309 gènes impliqués dans différentes voies de signalisation cellulaire (Livaja *et al.*, 2008). Parmi ces gènes, on distingue aussi des gènes de défense.

Livaja *et al.* (2008) ont constaté que sur les cellules d'*Arabidopsis* en suspension, le LPS<sub>B.cep</sub> n'induit que les gènes PR3 et PR4, alors que les études d'infiltration du LPS<sub>B.cep</sub> dans les feuilles d'*Arabidopsis* a révélé l'induction de plusieurs gènes PR (Zeidler *et al.*, 2004).

D'autres infiltrations de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*E. coli* dans les feuilles d'*Arabidopsis* révèlent l'induction des gènes PR1 et PR5 (Mishina and Zeier, 2007). Ces résultats suggèrent que les réponses aux LPS dépendent à la fois des différents systèmes de plantes (cultures cellulaires en suspension ou plante entière) et de l'origine des LPS. De même, le lipooligosaccharides de *X. campestris pv campestris* (LOS<sub>Xcc</sub>) est capable d'induire les gènes PR1 et PR2 dans les feuilles d'*A. thaliana* (Silipo et al., 2005) et le gène PR2 dans les feuilles du navet (*Brassica campestris*) (Newman et al., 1995). L'ensemble de ces effets spécifiques suggèrent que certaines plantes ont la capacité de reconnaître des structures bien particulières au sein des LPS (Erbs and Newman, 2012).

Par ailleurs, la lipoxycgénase (LOX), définie comme une enzyme clé de la voie oxylipines est également induite par le LPS de *Pseudomonas corrugata* (compatible) et de *Pectobacterium atrosepticum* (incompatibles) dans les cultures cellulaires de tabac (Desender et al., 2006). L'induction de gènes codant les petites protéines de choc thermique (sHSP, Small heat shock proteins) par le LPS a été observée chez le tabac et *Arabidopsis thaliana* (Livaja et al., 2008). Il a été aussi montré que le LPS provoque une déphosphorylation des sHSP dans le tabac. Cependant, il est encore difficile de savoir si cette action entraîne l'activation ou la désactivation de ces protéines (Gerber et al., 2006).

Un autre point important est que la plupart des gènes liés à la défense montre généralement un niveau de transcriptions relativement faible, exprimé 24h après le traitement par le LPS<sub>B.cep</sub> (Livaja et al., 2008). En plus, les concentrations de LPS requises pour obtenir la plupart des effets décrits ci-dessus sont entre 5 et 100 µg.ml<sup>-1</sup>, ce qui suggère que les plantes ne possèdent que des systèmes de faible affinité pour détecter les LPS (Erbs and Newman, 2012)

Enfin, une étude menée par Newman et al., (2007) montre que les LPS<sub>Xcc</sub> potentialise l'expression des gènes PR2 et PR6 dans les feuilles de poivre en réponse à *X. campestris pv. campestris* alors qu'il n'a aucun effet sur la transcription de la PAL. De même, les LPS de *Pectobacterium atrosepticum* sont incapable d'induire les gènes PAL chez divers cultivars de pomme de terre (Kröner et al., 2011).

### 3.3.8. La réaction hypersensible

La réaction d'hypersensibilité (HR) est un symptôme macroscopique attestant de l'attaque de la plante par un microorganisme pathogène (Newman et al., 2007) et l'étape finale de la mise

en place de la résistance active (Mur et al., 2008). C'est une réaction de défense locale caractérisée par un mécanisme de mort cellulaire programmée (PCD, programmed cell death) au point de pénétration de l'agent pathogène avirulent ou de son éliciteur. Elle entraîne la formation d'une nécrose se développant rapidement autour de l'agent pathogène, limitant ainsi sa propagation (Jones and Dangl, 2006).

Il est couramment admis que la PCD est une partie intégrante du développement des plantes et joue également un rôle important dans la résistance aux différents stress biotiques et abiotiques (Delgado et al., 2007). Elle est conservée chez tous les eucaryotes et la forme la mieux décrite et documentée, à ce jour reste l'apoptose animale. Cette forme de PCD se caractérise par plusieurs événements cellulaires incluant la condensation du cytoplasme et de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, l'induction d'activités caspases ou encore le dysfonctionnement des mitochondries (Greenberg and Yao, 2004; Mur et al., 2008). De façon générale, le développement de la PCD est un processus génétiquement contrôlé et nécessite l'induction de gènes spécifiques pour permettre l'activation de la machinerie cellulaire aboutissant à sa propre destruction. Elle nécessite également un métabolisme actif de la cellule végétale impliquant une synthèse protéique active (Heath, 2000). De plus, des études pharmacologiques ont montré que la modification des flux ioniques (Heath, 2000; Wendehenne et al., 2004; Zhang et al., 2012), la production de ROS (Heath, 2000; De Pinto et al., 2012; Lu et al., 2012), de NO (Delledonne et al., 2001; Leitner et al., 2009) et l'activation de protéines kinases (Oh and Martin, 2011) sont nécessaires au développement de la HR. La synthèse d'hormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou l'éthylène est également impliquée dans l'induction et la régulation de la HR (Brodersen et al., 2005; Zhang et al., 2011). Comme pour tout processus de PCD, la HR est caractérisée par une plasmolyse finale des cellules (Yu and Choi, 2000).

Elle est généralement associée à la résistance spécifique des plantes et à des interactions incompatibles, bien que les caractéristiques microscopiques de tissu nécrotique dans certaines interactions compatibles, sont identiques à une HR (Desender et al., 2007). De manière générale, la HR n'est pas un moyen de défense contre les agents pathogènes nécrotrophes (Spoel and Dong, 2008).

- *Mort cellulaire en réponse au LPS*

Bien que, Coventry et Dubery (2001) aient montré que le traitement des cellules de tabac par des concentrations élevées (200-800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de LPS de *Burkholderia cepacia* induit la mort cellulaire, ils n'ont pas caractérisé le type de mort cellulaire impliqué. Desaki et al (2006) ont mis en évidence sur la base de la fragmentation de l'ADN nucléaire que, le LPS de bactéries phytopathogènes (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia chrysanthemi* 3937, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et *Ralstonia solanacearum*) et non phytopathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella abortus* et *Klebsiella pneumoniae*) induit une PCD dans les cultures cellulaires de riz, ces mêmes LPS étant incapable de déclencher une mort cellulaire programmée chez les cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Ces résultats indiquent que la dose et l'origine des LPS ainsi que la nature des systèmes végétaux (suspension cellulaire/plante) sont des facteurs clé de la régulation des processus de PCD (Erbs and Newman, 2012).

- *Prévention de la HR et potentialisation de la défense de la plante par le LPS*

Un des premiers effets des LPS, décrit sur les feuilles de tabac est leur capacité à prévenir la HR (Erbs and Newman, 2012). Ces données découlent des observations faites sur des feuilles de tabac prétraitées par infiltration des cellules de *Ralstonia solanacearum* tuées par la chaleur et réinfectées par des cellules bactériennes vivantes. Le prétraitement des feuilles a empêché et/ou retardé l'apparition de la HR dans les interactions compatibles et incompatibles (Erbs and Newman, 2003; Newman et al., 2007). Des études de fractionnement de bactéries ont montré que le LPS étant thermorésistants étaient responsables de la suppression de la HR et contribuaient ainsi à la réduction du nombre de bactéries vivantes au site d'infection (Graham et al., 1977; Newman et al., 2000; Newman et al., 2001). Il est important de noter aussi, que cette prévention de la HR a été observée chez d'autres espèces végétales que le tabac et avec des bactéries pathogènes et non pathogènes (figure 12).



**Figure 12.** Suppression de la réponse hypersensible par un prétraitement avec le LPS dans les interactions plantes-bactéries, d'après (Newman et al., 2007)

La feuille d'*Arabidopsis thaliana* (de gauche) a été prétraitée par le lipooligosaccharide de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et (de droite) par de l'eau avant l'inoculation de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* portant le gène d'avirulence *avrRPM1*. La feuille de droite prétraitée par de l'eau déclenche la réaction d'hypersensibilité (HR). Tandis que la feuille de gauche, prétraitée par le LOS ne présente aucun signe de HR ni de nécrose visible.

Même en omettant que les LPS peuvent induire une PCD chez certains modèles (Desaki et al., 2006), ces données constituent un paradoxe, la HR étant connue pour contribuer aux défenses des plantes avec les réponses de résistance basales (Erbs et al. 2012).

Bien que la base moléculaire des mécanismes impliqués dans la suppression de la HR reste inconnue. Le prétraitement des plantes par le LPS ou autres MAMPs semble conduire à une expression accrue des systèmes de surveillance de certains effecteurs et protéines virales (Gerber et al., 2004, 2006). Par exemple, le LPS de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) et de *Salmonella enterica* sv. *minnesota* potentialise l'expression des gènes PR1 et PR2 dans les feuilles de poivre en réponse aux bactéries Xcc (Newman et al., 2007). De même, des oligosaccharides synthétisés chimiquement se sont avérés capables de supprimer la HR et d'induire la transcription des gènes PR1 chez *Arabidopsis*. (Bedini et al., 2005). D'autres travaux ont montré que le prétraitement des feuilles d'*Arabidopsis* par des bactéries non phytopathogènes (*Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli*) tuées à la chaleur améliore significativement la résistance locale et systémique des feuilles en réponse aux *Pseudomonas syringae*. Ceci suggère que le LPS est capables de déclencher une résistance systémique acquise (SAR) (Mishina and Zeier, 2007).

## **CHAPITRE 2**

### *Diversité génétique du Pectobacterium sp. : Analyse de séquences du gène pmrA*

## Chapitre 2. Diversité génétique du *Pectobacterium* sp. : Analyse de séquences du gène *pmrA*

### 1. Présentation

Le présent chapitre s'intéresse à l'étude de la biodiversité moléculaire de la sous espèce de l'agent *Pectobacterium* sp., responsable des pourritures molles de pomme de terre et en particulier de la sous espèce *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (*Pcc*). Ce travail a conduit au développement d'un nouvel outil moléculaire permettant l'identification et la caractérisation des sous espèces à travers l'analyse de la séquence nucléotidique du gène *pmrA*.

Ce travail s'inscrit dans les axes de recherche du Laboratoire de Virologie, Hygiène et Microbiologie (LVHM) qui ont été développé depuis quelques années au travers de la création d'une collection bactérienne représentative du pathogène (Anajjar et al., 2007; Terta et al., 2010). Aujourd'hui, Le LVHM dispose d'une centaine de souches de *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (*Pcc*), *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) et *Pectobacterium carotovorum brasiliensis*. Quatre-vingt-quinze pourcents des souches identifiées par des tests biochimiques, microbiologique et moléculaires (*pelB*, *pelC*, *pelY*, ITS, ERIC et 16S rDNA) ont été classées comme des *Pcc*. Dans ce travail de thèse, notre objectif au sein de LVMH avait pour buts :

- de participer à l'enrichissement et l'entretien du soucier existant de *Pectobacterium* sp, et
- d'évaluer la diversité intra-spécifique au sein de la sous espèce *Pcc*.

Pour cela, nous avons isolé 14 nouvelles souches de *Pcc* à partir d'échantillonnages effectués dans de la région du Grand Casablanca, auxquelles nous avons adjoint 15 souches de la même sous espèce déjà caractérisées au sein du soucier, dans le but d'évaluer la biodiversité génétique au sein de la sous espèce *Pcc*.

Nous avons utilisé pour la première fois, le gène *pmrA* comme marqueur moléculaire en complément de l'ARNr 16S classiquement utilisé. Le gène *pmrA* a souvent été étudié pour son rôle physiologique chez les bactéries pathogène pour l'homme (*Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae* et *E. coli*). De plus, une étude comparant la séquence du gène *pmrA* de *Pcc* à celle

de *Salmonella typhimurium* a révélé que quel que soit la nature de l'hôte bactérienne, le *pmrA* participe à la virulence du pathogène (Hyytiäinen et al., 2003). Dans la même étude, l'auteur montre que le *pmrA* participe aussi à la biosynthèse de la molécule LPS et que les effets d'un mutant *pmrA* observé chez les tubercules de pomme de terre sont similaires à celles observés chez *Arabidopsis thaliana*.

Par ailleurs, la comparaison entre les deux arbres phylogéniques du gène *pmrA* et du 16S rDNA de certaines souches de *Pcc* montre une classification globalement similaire. Ces résultats suggèrent que le gène *pmrA* pourrait être utilisé comme marqueur complémentaire dans les études phylogénétiques de *Pectobacterium carotovorum carotovorum*.

## 2. Méthodologie expérimentale

Protocole expérimental de l'identification moléculaire des souches de *Pectobacterium* et du séquençage du gène *pmrA* (voir annexe 1).

## 3. Article 2.1

**Titre en français :** Analyse des séquences du gène *pmrA* comme outil d'identification des *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* liées aux pourritures molles de pomme de terre.

**Mohamed Kettani-Halabi**, Meriam Terta, Mohamed Amdan, El Mostafa El Fahime, François Bouteau and Moulay Mustapha Ennaji.



## Article n°1

---

*Sequence analysis of a pmrA gene as a tool to identify Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum in relation to potato diseases.*

**Mohamed Kettani-Halabi**, Meriam Terta, Mohamed Amdan, El Mostafa El Fahime, François Bouteau and Moulay Mustapha Ennaji.

**Submitted in journal in BMC Microbiology**

**Sequence analysis of a *pmrA* gene as a tool to identify *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in relation to potato diseases.**

**Kettani-Halabi Mohamed<sup>1,3</sup>**, Terta Meriam<sup>1</sup>, Amdan Mohamed<sup>1</sup>, El Fahime El Mostafa<sup>2</sup>, Bouteau François<sup>3</sup> and Ennaji Moulay Mustapha<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie et Hygiène & Microbiologie FSTM - Université Hassan II Mohammedia – Casablanca, Maroc

<sup>2</sup>UATRS – CNRST, Angle Allal Fassi / FAR, Hay Riad 10 000 Rabat, Maroc

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut de Biologie des Plantes 91405 Orsay, France

**\*Corresponding author:** Moulay Mustapha Ennaji.

Address: Laboratoire de Virologie et Hygiène & Microbiologie, Université Hassan II Mohammedia – Casablanca, Faculté des Sciences et Techniques - Mohammedia - FSTM, BP 146, Mohammedia, 20650 , Morocco.

Tel: +212 (0)6 62 01 37 72 / +212 (0)6 61 74 88 62, Fax: +212 5 23 31 53 53

E-mail : m.ennaji@yahoo.fr

## Abstract

The species *Pectobacterium carotovorum* includes a diverse subspecies of pathogens that cause disease on a wide variety of plants. In Morocco, approximately 95% of the *P. carotovorum* isolates from potato plants with tuber soft rot are *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. However, identification of this pathogen is not always related to visual disease symptoms. This is especially true when different pathogen cause similar diseases on potato, citing as an example, *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* and *P. wasabiae*. Numerous conventional methods were used to characterize *Pectobacterium* sp., including biochemical assays, specific PCR-based tests, and construction of phylogenetic trees by using gene sequences. In this study, an alternative method is presented using a gene linked to pathogenicity, in order to allow accuracy at subspecies level. The *pmrA* gene has been used for identification and analysis of the relationships among twenty nine *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and other *Pectobacterium* subspecies. Phylogenetic analyses of *pmrA* sequences compared to ERIC-PCR and 16S rDNA sequencing, demonstrated that there is considerable genetic diversity in *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* strains, which can be divided into two distinct groups within the same clade. *pmrA* sequence analysis is likely to be a reliable tool to identify the subspecies *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and estimate their genetic diversity.

**Key words:** *pmrA* gene, *Pectobacterium carotovorum*, Potato tuber, Soft rot disease, Genetic diversity, Phylogenetic analysis.

## Introduction

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) is a plant-pathogenic enterobacterium which belongs to the soft-rot group of *Pectobacterium* and has the ability to cause serious damage worldwide on a numerous types of plants in field and storage stage (Perombelon and Kelman, 1980). In Morocco, approximately 95% of the *P. carotovorum* isolated from potato plants with tuber soft rot are *Pcc* (Terta et al., 2010b). These bacteria produce a wide variety of plant cell wall-degrading enzymes, causing maceration of different plant organs and tissues (Perombelon and Kelman, 1980; Norman-Setterblad et al., 2000). Many of its virulence genes have been identified, including genes encoding degradative enzymes, diverse regulatory systems, and the type III secretion system (Toth et al., 2003). *Pectobacterium* sp. is a complex taxon consisting of strains with a range of different phenotype, biochemical, host range and genetic characteristics. Several methods were used to characterize this taxon, including biochemical assays and construction of phylogenetic trees by using gene sequences. For example, Toth and his collaborators (Toth et al., 2001; Avrova et al., 2002; Toth et al., 2003; Bell et al., 2004; Toth et al., 2006) have shown that there are five major clades of *Pectobacterium* (formerly *Erwinia carotovora*): *atrosepticum*, *betavasculorum*, *carotovorum*, *odoriferum*, and *wasabiae*, but their analyses did not include *brasiliensis* which form individual clade (Ma et al., 2007). Recently, other authors (Tavasoli et al., 2011; Terta et al., 2012) were interested in molecular typing methods that are increasingly used in the analysis of *Pcc* relatedness in order to identify their transmission routes and to assess its biodiversity. They have demonstrated a high diversity of polymorphism between these subspecies.

To survive, colonize and cause disease, plant-pathogenic bacteria modulate expression of their genes often using two-component signal transduction systems (TCS). These systems typically consist of two conserved components, a sensor histidine kinase and a response regulator (Stock et al., 2000). *Pcc* employs different two-component systems for controlling production of virulence determinants (Frederick et al., 1997; Eriksson et al., 1998; Flego et al., 2000; Hyytiäinen et al., 2003). *PmrA-PmrB* is one example of TCS for plant pathogenic bacteria, which affects production of extracellular enzymes, virulence and bacterial survival in potato tubers as well as in *Arabidopsis* leaves and generally in planta (Hyytiäinen, 2005). The main target genes of this TCS encode products with sequence similarity to DNA binding response regulators and autophosphorylatable histidine kinases.

*pmrA* is a member of the PmrA-PmrB TCS involved in regulation of virulence in *Pcc* (Hyytiäinen et al., 2003). The PmrA locus is required for resistance to the cationic peptide antibiotic polymyxin B and to other plant-derived antimicrobial peptides in *Pectobacterium* and controls the production of proteins that mediate the modification of the lipopolysaccharide (LPS) core and lipid A (Helander et al., 1994; Gunn et al., 1998; Hyytiäinen, 2005). The changes in LPS structure leads to reduction of the negative charges at cell surface and hence altered interactions with iron and cationic peptides (Wösten and Groisman, 1999). This gene was found in almost all Enterobacteriaceae (Wösten and Groisman, 1999). In *Pcc*, *pmrA* gene encodes a protein of 222 amino acid (aa) that reveals 59.7% of identity to *pmrA* of *Salmonella* and *BasR* of *E. coli*. Its inactivation in *Pcc* does not reduce the maceration ability of the bacterium on potato tuber but nevertheless remains essential for survival in adverse environmental conditions (Wösten and Groisman, 1999; Gunn et al., 2000; Hyytiäinen et al., 2003). Phylogenies built with single genes have been used already to examine the relationships of the plant-pathogenic enterobacteria (Hauben et al., 1998; Brown et al., 2000; Gardan et al., 2003; Samson et al., 2005). In this study, *pmrA* sequence analysis was used to identify the subspecies of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and to estimate their genetic diversity. In addition, in at least one other system, this analysis was better correlated with ERIC-PCR assays and phylogenies built from 16S rDNA genes (Terta et al., 2012).

## **Materiel and methods**

### **Plant material, bacteria culture and experimental treatments**

During the years 2003 to 2011, different potato fields and the most important potato storages were surveyed in Morocco and sufficient samples were collected from plants suffering from soft rot disease. Nutrient agar, King's B agar, Crystal Violet Pectate (CVP) and LPGA medium were used to isolate the suspected bacteria. The 29 strains used in this study are isolated from different geographic Moroccan regions and had been stored in 20% glycerol at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Terta et al., 2010b; Terta et al., 2010a). Table 1 shows the strains whose sequences were determined in this study and the reference strains used for comparison when phylogenetic trees were constructed. Table 1 includes the strain designations and the GenBank accession numbers for the *pmrA* sequences.

### **Biochemical and phenotypic tests**

Biochemical tests-acid production from  $\alpha$ -methyl glucoside, trehalose, sorbitol, melibiose, and lactose, the productions of indole and lecithinase activity were done as previously described (see supplemental table for the fourteen strains used only in this study) (Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012).

### **DNA extraction and PCR amplification**

Bacterial cultures were revived from frozen stocks, streaked onto LPGA medium, suspended, and diluted with sterile  $\text{H}_2\text{O}$  at the concentration of  $10^8$  CFU.mL $^{-1}$ . DNA was extracted from bacterial suspension as described by Terta et al., (2010b). The precipitated DNA then was quantified using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), adjusted to 100 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  and stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . All PCR amplifications were performed using the following primers: *pmr A* F0145 (5'-TAC CCT GCA GAT GAA ATT ATT GAT TGT TGA AGA C-3') and E2477 (5'-TAC CAA GCT TTG GTT GTT CCC CTT TGG TCA-3') as described by Hyytiainen et al. (2003). A 25  $\mu\text{L}$  PCR mix contained: 1  $\mu\text{L}$  DNA, 0,5 U Taq DNA polymerase, 2,5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 2,5 mM each of dNTPs, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  of each primer. DNA amplification was performed on Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) under the following conditions: 5 min at  $94^{\circ}\text{C}$  for initial denaturation, 35 cycles of 1min at  $94^{\circ}\text{C}$  for, 1min at  $55^{\circ}\text{C}$  and 2 min  $72^{\circ}\text{C}$ , followed by a final elongation step of 10 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . PCR products (6  $\mu\text{L}$ ) were separated by gel electrophoresis in 1.8% agarose gels in TBE buffer.

Following staining with ethidium bromide, the gels were viewed and photographed under UV Transilluminator. Fragment sizes were determined by comparison to a 1-kb Plus DNA molecular weight marker.

### **Sequencing of *pmrA* and phylogenetic analysis**

The PCR-amplified fragments of *pmrA* were purified and the sequencing reactions were performed with a Big-Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). The *pmrA* sequences which we determined and the sequences of the reference strains of members of the family Enterobacteriaceae obtained from the GenBank databases were analyzed. The *pmrA* sequences were first aligned by using the Clustal W program (Larkin et al., 2007), and then the alignments were corrected by hand. Evolutionary trees for the data set were inferred by using the Neighbor-Joining program of MEGA (Saitou and Nei, 1987; Tamura et al., 2011). The stability of relationships was assessed by performing bootstrap analyses of the Neighbor-Joining data based on 500 resamplings. The entire sequences corresponding to positions 4317866-4318532 of the reference sequence of the subspecies.

### **Nucleotide sequence accession numbers**

The *pmrA* sequences which we determined have been deposited in the GenBank database under the accession numbers shown in Table 1.

## Results and discussion

Twenty-nine isolates from soft-rotted potato tubers (Table 1) were used in this study.

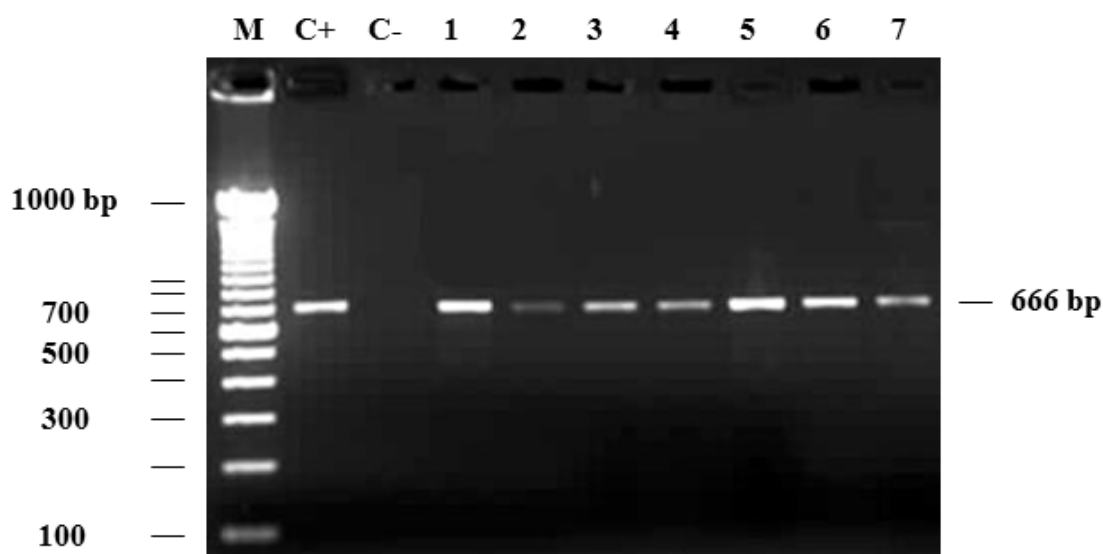
**Table 1. Strains used in this study**

Species/subspecies <sup>a</sup>	Accession no	Isolates	Year isolated	Moroccan city	Reference
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	JQ278721	P603AH1	2003	Ain halouf	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012)
	JQ278727	P106F1	2006	Fes	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012)
	JQ278728	P116SK1	2006	Sidi kacem	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012)
	JQ278731	P606SK2	2006	Sidi kacem	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2010a)
	JQ278738	P606SK5	2006	Sidi kacem	(Terta et al., 2010b)
	JQ278736	P606Sd2	2006	Sidi slimane	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012)
	JQ278748	P126SI1	2006	Sidi issa	(Terta et al., 2010b)
	JQ278749	P116C2	2006	Casablanca	(Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012)
	JQ278739	P507CH1	2007	Chtouka	(Terta et al., 2010b)
	JQ278742	P507K12	2007	Kenitra	(Terta et al., 2010b)
	JQ278724	P111C1	2011	Casablanca	This study
	JQ278744	P603AH2	2003	Ain halouf	(Terta et al., 2012)
	JQ278741	1349	2003	Ain halouf	(Terta et al., 2010a)
	JQ278725	P106F2	2006	Fes	This study
	JQ278732	P606Sd3	2006	Sidi slimane	This study
	JQ278746	1351	2006	Casablanca	(Terta et al., 2010a)
	JQ278743	P507C4	2007	Casablanca	This study
	JQ278729	P507BM2	2007	Beni mellal	(Terta et al., 2012)
	JQ278726	P111C2	2011	Casablanca	This study
	JQ278723	P111C3	2011	Casablanca	This study
	JQ278737	P111C4	2011	Casablanca	This study
	JQ278734	P109C1	2009	Casablanca	This study
	JQ278733	P109C2	2009	Casablanca	This study
	JQ278740	P109C3	2009	Casablanca	This study
	JQ278730	P211C1	2011	Casablanca	This study
	JQ278735	P211C2	2011	Casablanca	This study
	JQ278747	P211C3	2011	Casablanca	This study
	JQ278722	P211C4	2011	Casablanca	This study
	JQ278745	132C	2006	Casablanca	(Terta et al., 2010a)

<sup>a</sup> All strains have for hosts: potato and for *pmrA*-PCR product : 666 pb

They have been identified by biochemical and phenotypic tests (supplemental table). A part of the strains were already confirmed as *Pcc* using ERIC-PCR (Terta et al., 2010b; Terta et al., 2012). However, all strains yielded a 434 bp DNA fragment in PCR with the Y1 and Y2 specific primers for pectate lyase (*pel*) genes of *Pectobacterium* sp, (Darrasse et al., 1994; Duarte et al., 2004) and a 666 pb with specific primers for *pmrA* of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (F0145 and E2477) (Hyytiainen et al., 2003; figure 1).



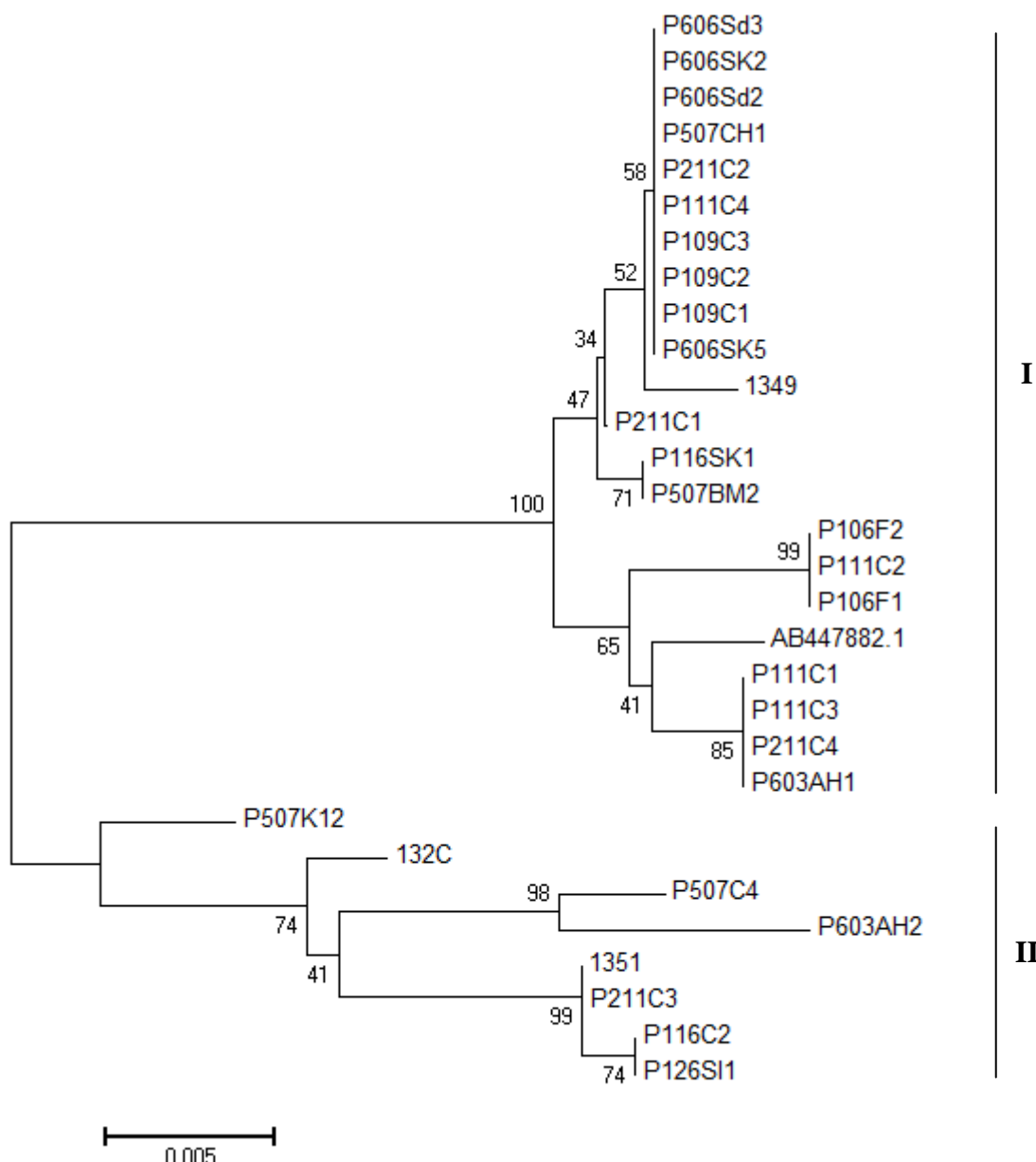


**Figure 1. Amplification of a specific 666 bp band in 7 strains generated using *pmrA* F0145 and E2477 primers.**

Abbreviation: M, Marker (1-kb); C+, positive control; C-, negative control and from 1 to 7: isolates of the collection.

Our purpose in this study was to develop a tool with a high specificity to detect typical *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Morocco and that could serve as a tool to evaluate the genetic diversity of these subspecies. To investigate the utility of *pmrA*-PCR as a method of identification, the dendrogram built (figure 2) from well-characterized strains was used to illustrate the clustering of subspecies, on the basis of a single-gene *pmrA*. Our phylogenetic tree (figure 2) revealed a high diversity among the subspecies tested with a maximum identity to the *pmrA* gene of strain WPP14 (AB447882.1), which is a highly American virulent strain, ranging from 95 to 99%.

Moreover, phylogenetic distance between all strains is 0,02 suggesting that all *Pcc* circulating in Morocco, have their origin from the United States (Yap et al., 2004; Glasner et al., 2008). Following numerical analysis of the 29 *pmrA* sequences by Neighbor-Joining (NJ) and UPGMA, the taxa were divided into two groups (clusters I to II), the similarity value between the two main clusters was about 96%. However, both clusters were represented by six different sequences (figure 2) and over 50% of the strains were included in the cluster I. Detailed scrutiny of the results given by the NJ method showed that all *Pcc* formed only one clade with 99% bootstrap.



**Figure 2. Phylogenetic tree based on a comparison of *pmrA* sequences for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.**

The branching pattern was generated by the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a Neighbor-Joining analysis of 500 resampled data sets. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. The generation of tree was conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

However, to verify the genetic diversity within our subspecies, the sequence alignment with maximum composite likelihood method (ML) were used. A comparison of 13 different *pmrA*

*Chapitre 2 : Diversité génétique chez le Pectobacterium sp. : Analyse de la séquence du gène PmrA*  
*Sequence analysis of a pmrA gene as a tool to identify Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum in relation to potato diseases.*

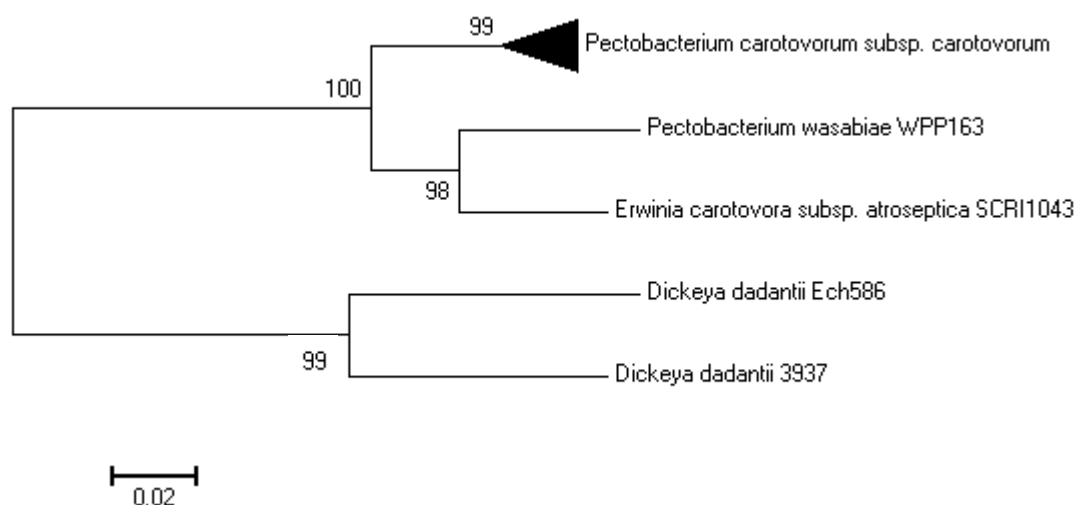
AB447882.1	ATG AAA TTA TTG ATT GTT GAA GAC GAT AAG CTG TTG CAG GAA GGA TTA TTA TTG GCG TTG AGT CAT GAA GGT TAT GCC TGC GAT TGT GCA GGC ACG	[ 96]
P109C2	...	[ 96]
1349	...	[ 96]
P211C1	...	[ 96]
P116SK1	...	[ 96]
P106F1	...	[ 96]
P603AH1	...	[ 96]
P507K12	...	[ 96]
132C	...	[ 96]
P603AH2	...	[ 96]
P507C4	...	[ 96]
1351	...	[ 96]
P126SI1	...	[ 96]
AB447882.1	GCC AAA GAA GCG GAC GCG CTC ATC AGC AGC GCG CAT TAC AGT CTG GTT ATT CTC GAT CTT GGC CTA CCA GAT GAA GAT GGA CTC ACC TTG CTG TCA	[192]
P109C2	...	[192]
1349	...	[192]
P211C1	...	[192]
P116SK1	...	[192]
P106F1	...	[192]
P603AH1	...	[192]
P507K12	...	[192]
132C	...	[192]
P603AH2	...	[192]
P507C4	...	[192]
1351	...	[192]
P126SI1	...	[192]
AB447882.1	CGC TGG CGT AAG AAT CAT TAC CAG CAT CCC GTA CTC ATC TTA ACC GCA CGG GAT AAG GTA AAC GAC CGC GTC AGC GGG CTG GAT GTC GGC GCA GAC	[288]
P109C2	...	[288]
1349	...	[288]
P211C1	...	[288]
P116SK1	...	[288]
P106F1	...	[288]
P603AH1	...	[288]
P507K12	...	[288]
132C	...	[288]
P603AH2	...	[288]
P507C4	...	[288]
1351	...	[288]
P126SI1	...	[288]
AB447882.1	GAT TAC CTT GCC AAG CCT TTC GCT CTG ACG GAA TTA CAG GCG GCG GTA GCG GCG CTG ATT GCG GCG AAT CAG GGT TCA AGC AAC AGC AAA ATA CAG	[384]
P109C2	...	[384]
1349	...	[384]
P211C1	...	[384]
P116SK1	...	[384]
P106F1	...	[384]
P603AH1	...	[384]
P507K12	...	[384]
132C	...	[384]
P603AH2	...	[384]
P507C4	...	[384]
1351	...	[384]
P126SI1	...	[384]
AB447882.1	GTC GAC AAC ATT ACG CTG GAT TTA AAC AAT CAA CAG GTG TTG CTG GAT GAC AAG CCA GTG GTG CTG ACG CCG AAA GAG TTT GCG ATA CTG TCC GCG	[480]
P109C2	...	[480]
1349	...	[480]
P211C1	...	[480]
P116SK1	...	[480]
P106F1	...	[480]
P603AH1	...	[480]
P507K12	...	[480]
132C	...	[480]
P603AH2	...	[480]
P507C4	...	[480]
1351	...	[480]
P126SI1	...	[480]
AB447882.1	CTG GTG CTG AAA GCC GGC TCT CAG GTA CAT CGT GAG GTT CTG CAT CAG GAT ATT TAT GCC TGG AAC GAT GAC CCG TCT TCC AAC TCA CTG GAA GTG	[576]
P109C2	...	[576]
1349	...	[576]
P211C1	...	[576]
P116SK1	...	[576]
P106F1	...	[576]
P603AH1	...	[576]
P507K12	...	[576]
132C	...	[576]
P603AH2	...	[576]
P507C4	...	[576]
1351	...	[576]
P126SI1	...	[576]
AB447882.1	CAT ATC CAC AAT CTG CGT CAC AAG ATA GGG AAA GAC GCG ATC CGA ACC CTG CGA GGT TTT GGC TAT CTG CTG ACT AAA GGC GAA CAA CCA	[666]
P109C2	...	[666]
1349	...	[666]
P211C1	...	[666]
P116SK1	...	[666]
P106F1	...	[666]
P603AH1	...	[666]
P507K12	...	[666]
132C	...	[666]
P603AH2	...	[666]
P507C4	...	[666]
1351	...	[666]
P126SI1	...	[666]

**Figure 3. Nucleic acid sequence alignment of *pmrA* gene among various strains of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.**

*Pcc pmrA* gene for response regulator PmrA (AB447882.1) available in GenBank was downloaded from NCBI. The alignments were performed using the ClustalW program (Larkin et al., 2007). The identical Nucleic acid in equivalent positions are indicated by dots and generated using the MEGA 5 program (Tamura et al., 2011).

sequences (figure. 3) revealed 0.05 as estimated value of the shape parameter for the discrete Gamma Distribution. The intraspecies comparison of DNA sequence identity is determined by the BLAST algorithm for *Pcc* strains for *pmrA* gene. This finding suggests that there is considerable genetic diversity in *Pcc* strains, which is in accordance with previous works reported by different authors (Gardan et al., 2003; Yap et al., 2004; Ma et al., 2007; Anajjar et al., 2007, Terta et al., 2012). Also, the multiple sequence alignment of these sequences revealed conserved regions at different stretches. This region could be used for designing degenerate primers or probes for PCR-based amplification or hybridization-based detection of *pmrA* sequences from different types of organisms. Furthermore, within the genus *Pectobacterium*, there are five major clades forming a polyphyletic group: *P. atrosepticum*, *P. betavascularum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. odoriferum* (Gardan et al., 2003), and *P. wasabiae*. These analyses did not include *P. brasiliensis* strains (Duarte et al., 2004).

Our phylogeny (figure 4) places all the strains previously identified using biochemical and phenotypic methods in the group *Pcc*, noting that, some potato strains collected in different years and in widely different locations were grouped closely in the same group. It places also *P. brasiliensis* more similar to *Pcc* than to *P. atrosepticum* (*E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043) and *P. wasabiae* WPP163, knowing that the level of similarity between the two *pmrA* sequences subspecies *P. atrosepticum* and *Pcc* is 98.19%. However, our results do not support maintaining these subspecies designation because the level of divergence is very similar to or less than that observed within other clades, such as *P. atrosepticum* and *P. wasabiae* clades. Many others phylogenetic analysis revealed that not all subspecies of *P. carotovorum* were grouped in a single, robust clade identified by all methods (Ma et al., 2007; Glasner et al., 2008). This was a strong indication that the different subspecies of *P. carotovorum* could indeed belong to different species.



**Figure 4. Compressed subtree sequenced data for *pmrA* gene of 5 *Enterobacteriaceae* based upon Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987).**

Subtrees presented in figure 2 are compressed into black triangle. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a Neighbor-Joining analysis of 500 resampled data sets. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2011) and are in the units of the number of base substitutions per site. The generation of tree was conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Therefore, some authors have concluded that the phylogenies built with single genes do not have many informative characters and they “may not accurately reflect interspecies taxonomic relatedness” (Brown et al., 2000). However, a phylogenetic analysis of *pmrA* sequences is sufficient to determine whether all of these subspecies can be placed in the same subspecies or to split into two different subspecies. Noting that, the *pmrA* gene sequences have several advantages, including being effectively a single-copy gene, highly conserved and easy to amplify. Therefore, the sequencing and analysis sequence data for the *pmrA* region of *Pcc* strains could be a reliable tool for detection of pathogens. Moreover, *pmrA* sequence analysis has shown a high genetic diversity among the isolates *Pcc*. The same results have been reported by other studies (Toth et al., 2001; Gardan et al., 2003; Ma et al., 2007; Glasner et al., 2008; Terta et al., 2010b) using several phylogenetic analyses seeking to understand the relationship among these nominal subspecies.

In conclusion, our *pmrA* gene sequence analysis, linked to pathogenicity studies, could be used to identify and monitor the diversity of the *Pcc* subspecies.

## Acknowledgements

This work was supported by the Agronomic Research for Development Project PRAD N° 07-07 and the “Agence Universitaire de la Francophonie” (AUF).

## References

- Anajjar, B., Aitmhand, R., Timinouni, M., and Ennaji, M.M. 2007. Caractérisation par PCR de deux souches d'*Erwinia carotovora* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre dans la région du grand Casablanca au Maroc. *EPPO Bulletin* 37:175-180.
- Avrova, A.O., Hyman, L.J., Toth, R.L., and Toth, I.K. 2002. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of the Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1499-1508.
- Bell, K.S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M.T.G., Hyman, L.J., Holeva, M.C., Thomson, N.R., Bentley, S.D., Churcher, L.J.C., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M.A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G.P.C., Birch, P.R.J., Parkhill, J., and Toth, I.K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11105-11110.
- Brown, E.W., Davis, R.M., Gouk, C., and van der Zwet, T. 2000. Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:2057-2068.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1437-1443.
- Duarte, V., De Boer, S.H., Ward, L.J., and de Oliveira, A.M.R. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96:535-545.
- Eriksson, A.R.B., Andersson, R.A., Pirhonen, M., and Palva, E.T. 1998. Two-Component Regulators Involved in the Global Control of Virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:743-752.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Koiv, V., Karlsson, M.B., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. 2000. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:447-455.
- Frederick, R.D., Chiu, J., Bennetzen, J.L., and Handa, A.K. 1997. Identification of a Pathogenicity Locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* That Encodes a Two-Component Sensor-Regulator Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:407-415.

- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:381-391.
- Glasner, J.D., Marquez-Villavicencio, M., Kim, H.S., Jahn, C.E., Ma, B., Biehl, B.S., Rissman, A.I., Mole, B., Yi, X., Yang, C.H., Dangl, J.L., Grant, S.R., Perna, N.T., and Charkowski, A.O. 2008. Niche-Specificity and the Variable Fraction of the *Pectobacterium* Pan-Genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1549-1560.
- Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., and Miller, S.I. 2000. Genetic and functional analysis of a *PmrA*-*PmrB*-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity* 68:6139-6146.
- Gunn, J.S., Lim, K.B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., and Miller, S.I. 1998. *PmrA*-*PmrB*-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology* 27:1171-1182.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:384-397.
- Helander, I.M., Kilpeläinen, I., and Vaara, M. 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a 31P-NMR study. *Molecular Microbiology* 11:481-487.
- Hyttiäinen, H., Sjöblom, S., Palomaki, T., Tuikkala, A., and Palva, E.T. 2003. The *PmrA*-*PmrB* two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Molecular Microbiology* 50:795-807.
- Hyttiäinen, H. 2005. Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, thèse de doctorat, 2005:24-05.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J., Glasner, J.D., Perna, N.T., Kelman, A., and Charkowski, A.O. 2007. Host range and molecular Phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *dickeya*. *Phytopathology* 97:1150-1163.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T. 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:430-438.
- Perombelon, M.C.M., and Kelman, A. 1980. Ecology of the Soft Rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* 18:361-387.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Saux, M.F.-L., Achouak, W., and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973

- and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1415-1427.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. 2000. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 69:183-215.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11030-11035.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, doi:10.1093
- Tavasoli, E., Marefat, A.R., and Hassanzadeh, N. 2011. Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran, *African Journal of Plant Science*, 6:329-336.
- Terta, M., Azelmat, S., M'hand, R., Achbani, E., Barakate, M., Bouteau, F., and Ennaji, M. 2012. Molecular typing of *Pectobacterium carotovorum* isolated from potato tuber soft rot in Morocco. *Annals of Microbiology*:1-7.
- Terta, M., Kettani-Halabi, M., Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'Hand, R.A., El-Maarouf-Bouteau, H., Val, F., Ennaji, M.M., and Bouteau, F. 2010a. *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:139-143.
- Terta, M., El Karkouri, A., Ait M'hand, R., Achbani, E., Barakate, M., Amdan, M., Annajar, B., El Hassouni, M., Val, F., Bouteau, F., and Ennaji, M.M. 2010b. Occurrence OF *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 56 Suppl:OL1324-1333.
- Toth, I.K., Avrova, A.O., and Hyman, L.J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4070-4076.
- Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, P.R.J. 2006. Comparative Genomics Reveals What Makes An Enterobacterial Plant Pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 44:305-336.
- Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., and Birch, P.R.J. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4:17-30.
- Wösten, M.M.S.M., and Groisman, E.A. 1999. Molecular Characterization of the *PmrA* Regulon. *Journal of Biological Chemistry* 274:27185-27190.
- Yap, M.N., Barak, J.D., and Charkowski, A.O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 70:3013-3023.



**Supplementary table 1.** Phenotypic characteristics of the strains of *Pectobacterium* isolated from potato in comparison with standard isolate.

Test	Results		
	Number of strains positive or negative/number of strains tested	Positive strains (%)	Standard isolate <i>P. carotovorum</i>
Gram reaction	- (14/14)	0	-
Fermentative growth	+ (14/14)	100	+
Potato soft rot	+ (14/14)	100	+
Oxidase	- (14/14)	0	-
Catalase	+ (14/14)	100	+
Lecithinase	- (14/14)	0	-
Gelatin hydrolysis	+ (12/14)	86.7	+
Gas from glucose	- (13/14)	6.6	-
Growth at 37°C	+ (14/14)	100	+
Production of Indole	- (13/14)	6.6	-
Pigment production	- (14/14)	0	-
Nitrates reduction	+ (14/14)	100	+
Pectinolytic activity	+ (14/14)	100	+
Acid production from:			
Glucose	+ (14/14)	100	+
Fructose	+ (14/14)	100	+
$\alpha$ -methyl-D-glucoside	- (14/14)	0	-
Sorbitol	+ (12/14)	86.7	+
Melibiose	+ (14/14)	100	+
Arabitol	- (14/14)	0	-
Lactose	+ (14/14)	100	+
Trehalose	+ (14/14)	100	+

+, positive reaction; -, negative reaction.

The 14 strains correspond to the strains used only in this study (table 1).

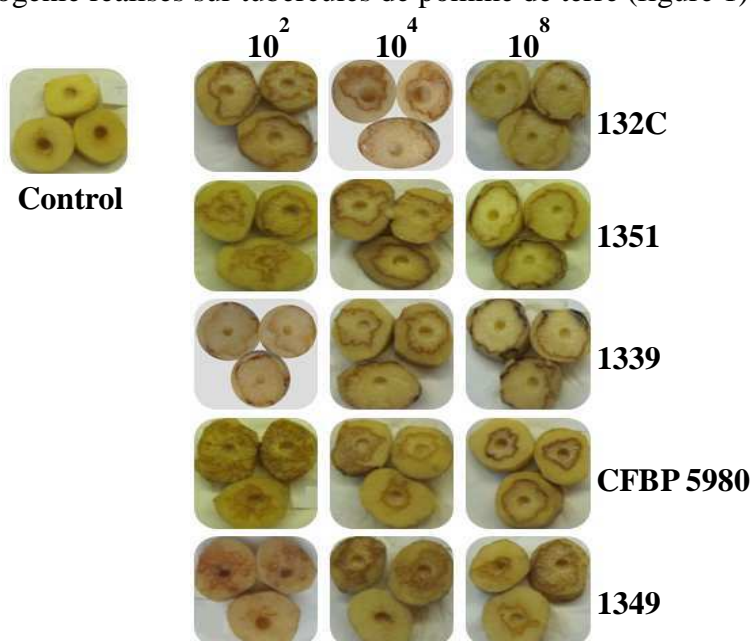
## **CHAPITRE 3**

*Evaluation de la diversité  
d'agressivité de différentes  
souches de *Pectobacterium  
carotovorum*.*

## Chapitre 3. Evaluation de la diversité d'agressivité de différentes souches de *Pectobacterium carotovorum*.

### 1. Présentation

De nombreuses études ont eu pour but d'analyser la diversité génétique des espèces de *Pectobacterium*, le choix des marqueurs génétiques étant dans la mesure du possible corrélé avec le pouvoir pathogène de ces bactéries (Aittamaa et al 2008; Helias et al. 2004; Mäki-Vlakama et Karjalainen 2008; Parent et al. 1996; Sledi et al. 2000). Très peu d'études se sont intéressées directement à l'analyse de la diversité de l'agressivité de ces bactéries. Notre objectif pour le travail présenté dans ce chapitre était de mettre au point un outil permettant d'évaluer facilement et rapidement la potentielle diversité d'agressivité existant entre les souches de *Pectobacterium carotovorum*. Pour cela nous avons infecté des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* avec différentes souches issues de notre souche ainsi que la souche CFBP5980 issue de la Collection Française des Bactéries Pathogènes et connue pour son fort pouvoir pathogène. L'évaluation de l'agressivité des souches de *Pectobacterium carotovorum* sur cellules d'*Arabidopsis thaliana* a été effectuée en quantifiant les cinétiques de mort cellulaire induites dans les cultures, les cinétiques d'activité des pectate-lyases, et les cinétiques de fuites des électrolytes, paramètres associés à la pathogénie de ces bactéries. Les résultats obtenus ont été comparés à des tests classiques de pathogénie réalisés sur tubercules de pomme de terre (figure 1).



**Figure 1.** Test de pathogénie des souches de *Pectobacterium carotovorum* à différentes concentrations sur tubercules de pomme de terre.

Ce travail nous a permis de déterminer une séquence d'agressivité conservée chez les tubercules de pomme de terre et les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* et donc de valider l'utilisation de culture de cellules *A. thaliana* comme système fiable et rapide d'analyse de la diversité d'agressivité de ces bactéries. Ce travail a été publié dans la revue *Molecular Plant Microbe Interaction* sous forme d'une note technique présentée ci-après.

## 2. Méthodologie expérimentale

Protocole expérimental de détection de niveau d'agressivité des souches de *Pectobacterium carotovorum*. (Voir annexe 2).

## 3. Article 3.1

**Titre en Français :** Cellules d'*Arabidopsis thaliana* : un modèle d'évaluation de la virulence des *Pectobacterium carotovorum*.

**Mohamed Kettani-Halabi**\*, Meriem Terta\*, Khadija Ibenyassine, Daniel Tran, Patrice Meimoun, Rajae Ait M'Hand, Hayat El-Maarouf-Bouteau, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, and François Bouteau (\*: co-authors).

## Article n°2

---

### *Arabidopsis thaliana cells; A model of evaluation virulence in Pectobacterium carotovorum*

**Mohamed Kettani-Halabi**\*, Meriem Terta\*, Khadija Ibenyassine, Daniel Tran, Patrice Meimoun, Rajae Ait M'Hand, Hayat El-Maarouf-Bouteau, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, and François Bouteau (\*: co-authors)

**Published in Molecular Plant Microbe Interactions**

TECHNICAL ADVANCE

## *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*

Meriam Terta,<sup>1,2</sup> Mohamed Kettani-Halabi,<sup>1,2</sup> Khadija Ibenyassine,<sup>1,2</sup> Daniel Tran,<sup>1</sup> Patrice Meimoun,<sup>1</sup> Raja Ait M'hand,<sup>2</sup> Hayat El-Maarouf-Bouteau,<sup>3</sup> Florence Val,<sup>4</sup> M. Mustapha Ennaji,<sup>2</sup> and François Bouteau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LEM-EA3514–Université Paris Diderot–Paris 7, 2 place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, France; <sup>2</sup>LVHM–Université Hassan II Mohammedia–FSTM, Maroc; <sup>3</sup>UR5–UPMC, 3 rue Galilée, 94200 Ivry sur Seine, France; <sup>4</sup>UMR 1099 BIO3P INRA–Agrocampus Ouest–Université Rennes 1, France

Submitted 27 March 2009. Accepted 8 October 2009.

*Pectobacterium carotovorum* are economically important plant pathogens that cause plant soft rot. These enterobacteria display high diversity world-wide. Their pathogenesis depends on production and secretion of virulence factors such as plant cell wall–degrading enzymes, type III effectors, a necrosis-inducing protein, and a secreted virulence factor from *Xanthomonas* spp., which are tightly regulated by quorum sensing. *Pectobacterium carotovorum* also present pathogen-associated molecular patterns that could participate in their pathogenicity. In this study, by using suspension cells of *Arabidopsis thaliana*, we correlate plant cell death and pectate lyase activities during coinfection with different *P. carotovorum* strains. When comparing soft rot symptoms induced on potato slices with pectate lyase activities and plant cell death observed during coculture with *Arabidopsis thaliana* cells, the order of strain virulence was found to be the same. Therefore, *Arabidopsis thaliana* cells could be an alternative tool to evaluate rapidly and efficiently the virulence of different *P. carotovorum* strains.

*Pectobacterium carotovorum* (formerly *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) are gram-negative, enteric bacteria that are economically important plant pathogens causing plant soft rot (Perombelon 2002; Toth et al. 2006). Production and secretion of virulence factors are key steps to the pathogenesis of these bacteria. Their primary virulence characteristic is the coordinated production of large amounts of multiple secreted plant cell wall–degrading enzymes (PCWDE). By cleaving structural polymers in the primary cell wall and middle lamella, PCWDE facilitate pathogen colonization and promote exploitation of the environment for nutrients released from killed cells (Toth et al. 2006). The development of maceration symptoms leads to the breakdown of plant tissues and the onset of soft rot disease (Barras et al. 1994; Collmer 1983; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996). In addition to these PCWDE, *P. carot-*

*ovorum* also produce other secreted virulence factors, including type III effectors (Holeva et al. 2004; Kariola et al. 2003), a necrosis-inducing protein (Mattinen et al. 2004; Pemberton et al. 2005), and a secreted virulence factor from *Xanthomonas* spp. (Corbett et al. 2005). In *P. carotovorum*, production of PCWDE and the other secreted virulence factors is tightly regulated by *N*-acyl homoserine lactone (AHL) quorum sensing (QS) (Laasik et al. 2006; Toth et al. 2006). QS is a mechanism of cell to cell communication in which a bacterial population coordinately regulates gene expression in response to cell density by the production and detection of the AHL signal (Barnard and Salmon 2007; Perombelon 2002; Toth et al. 2006). *Pectobacterium carotovorum*, as all gram-negative bacteria, also exhibit pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipopolysaccharides, the major PAMPs of enterobacteria, which could be potential pathogenic determinants (Toth et al. 2006) independent of QS.

Despite this general scheme, *P. carotovorum* strains isolated from host plants world-wide are surprisingly diverse (Duarte et al. 2004; Gross et al. 1991; Seo et al. 2002; Sledi et al. 2000; Yap et al. 2004). Many studies have analyzed the genetic diversity of *Pectobacterium* species (Aittamaa et al. 2008; Helias et al. 2004; Mäki-Vlakama and Karjalainen 2008; Parent et al. 1996; Sledi et al. 2000); however, the analysis of virulence diversity remains difficult for these bacteria. The objective of this work was to evaluate the virulence of different *P. carotovorum* strains by using *Arabidopsis thaliana* suspension cells.

## RESULTS AND DISCUSSION

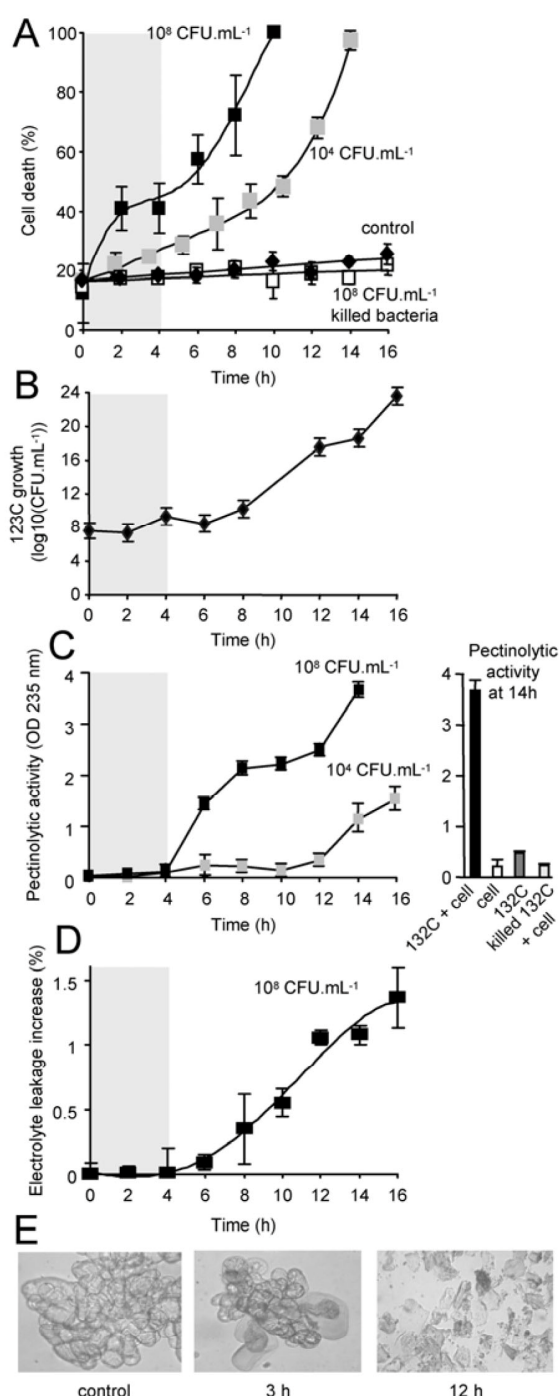
*Pectobacterium carotovorum* are known to trigger defense responses and cell death in *A. thaliana* (Kariola et al. 2003). To assess the virulence of *P. carotovorum*, we measured *A. thaliana* cell death by using cultured suspension cells, a convenient material for studying physiological events induced by pathogens or molecules derived from pathogens (Atkinson et al. 1986; Bouizgarne et al. 2006; Errakhi et al. 2008; Reboutier and Bouteau 2008; van Loon et al. 2008). Coculture of *A. thaliana* cells with 10<sup>8</sup> CFU of *P. carotovorum* 132C per milliliter led to a biphasic increase in plant cell death, i.e., a rapid but limited increase during the first 4 h, followed by a large exponential increase leading to death of all *A. thaliana* cells after 10 h (Fig. 1A). No significant increase in cell death was observed for control cultures with plant cells alone or those infected with heat-killed bacteria at a rate of 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>−1</sup>

M. Terta and M. Kettani-Halabi participated equally to this work

Corresponding author: F. Bouteau; E-mail: francois.bouteau@univ-paris-diderot.fr; Telephone: +33 (0)1 44 27 60 44; Fax: +33 (0)1 44 27 78 13.

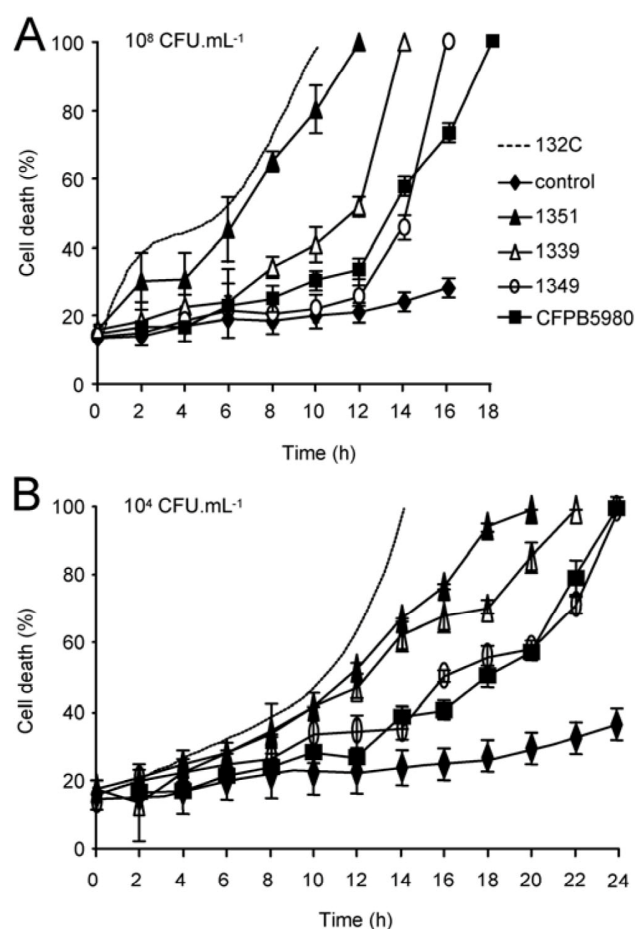
\* The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that a supplementary table is published online.





**Fig. 1. A**, Time course of *Arabidopsis thaliana* cell death after inoculation with *Pectobacterium carotovorum* 132C at rates of either  $10^8$  or  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Controls were made with plant cells alone or cells infected with heat-killed bacteria ( $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>). **B**, Time course of the growth of strain 132C ( $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>) in Gamborg medium without plant cells. **C**, Time course of pectinolytic activities (measured by oligogalacturonate accumulation) in the culture medium after inoculation of *A. thaliana* cells with strain 132C at either  $10^8$  or  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Pectinolytic activities measured in culture medium after 14 h of coculture with *P. carotovorum* at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> compared with strain 132C alone, plant cells alone, and plant cells infected with heat-killed bacteria ( $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>). **D**, Time course of electrolyte leakage increase in the culture medium during coculture of *A. thaliana* cell after inoculation with strain 132C at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. **E**, Light micrographs of *A. thaliana* cells stained with Evans blue before (control) and 3 and 12 h after inoculation with *P. carotovorum* at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Data represent the mean of three independent replicates and error bars correspond to standard errors.

(Fig. 1A). Bacterial growth in the plant cell medium ( $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> without *A. thaliana* cells; Fig. 1B) was found to be delayed and began after 6 h. This indicated that the observed plant cell death was dependent on events induced by the coculture and could not be ascribed to a simple increase of bacteria in the culture medium. When the coculture was made with strain 132C at  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, cell death increased slightly from the first hours and the exponential increase in cell death was delayed after 10 h of coculture (Fig. 1A). *P. carotovorum* is characterized by its ability to produce high levels of PCWDE, especially pectate lyase, which are primarily responsible for the degradation of plant cell-wall components leading to cell death and tissue maceration (Barras et al. 1994; Collmer 1983; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996). An increase in pectate lyase activities, measured by oligogalacturonate accumulation, was effectively detected in the coculture medium about 4 h after the beginning of coculture with strain 132C at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> and this was delayed to 10 h with a rate of  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup> (Fig. 1C). The kinetics of the exponential cell death and pectate lyase activities appear to be correlated (Fig. 1A and C), as expected from previous data highlighting the predominant role of PCWDE secretion in *P. carotovorum* virulence (Toth et al. 2006). A 14-h culture of strain 132C alone showed low pectinolytic activities, and this was also observed in controls containing plant cells alone or cells infected with heat-killed bacteria (Fig. 1C, inset). Such data indicate that



**Fig. 2.** Time course of *Arabidopsis thaliana* cell death during coculture after inoculation with *Pectobacterium carotovorum* strains 1351, 1339, 1349 and CFPB5980 at rates of either **A**,  $10^8$  or **B**,  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Dashed lines with no symbols correspond to the data of strain 132C. Data represent the mean of three independent replicates and error bars correspond to standard errors.

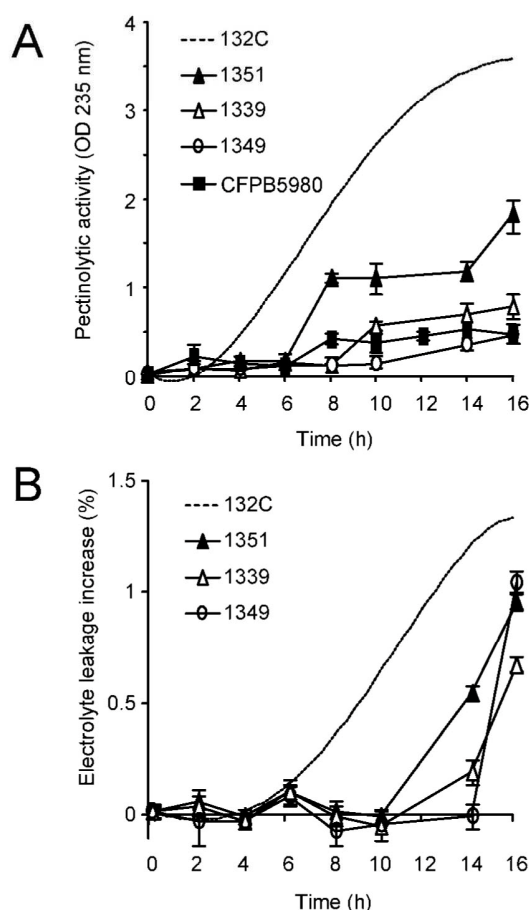
PCWDE secretion is linked to the coculture conditions. Previously, it has been shown that production and secretion of PCDWE is activated in the presence of pectin and plant extracts (Barras et al. 1994). An increase in electrolyte leakage, measured as an increase in conductivity of the culture medium, could also be recorded during coculture. This increase in conductivity showed the same kinetics as the change in pectate lyase activities (Fig. 1C and D), and it could be explained by cell breakage as revealed by Evans blue (EB) staining, since cell integrity was not preserved when pectate lyase activities increased (Fig. 1E). These data clearly demonstrate that *P. carotovorum* recognized *A. thaliana* suspension cells as host cells, which allowed the virulence process leading to cell death to be induced.

Upon infection of the suspension cells with *P. carotovorum* 132C at rates of  $10^8$  or  $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup>, a small initial increase (of about 30%) in plant cell death could be seen before the exponential cell death phase. This initial cell death could not be ascribed to PCWDE secretion, since dead cells only displayed plasmolysis and not cell-wall degradation (Fig. 1E). Moreover, this cell death occurred before pectate lyase activities were detectable (before 4 or 10 h for  $10^8$  or  $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup>, respectively; Fig. 1A and C). Coculture of cells with heat-killed bacteria did not show any induction of this early and

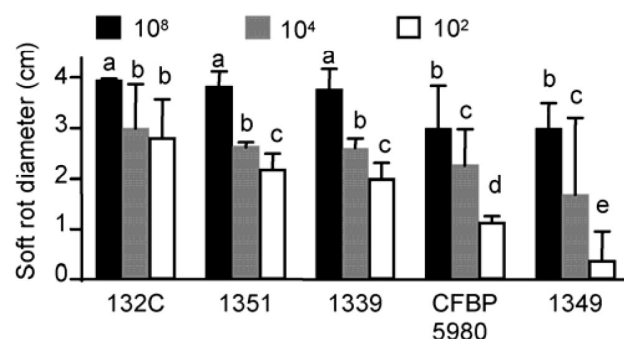
limited cell-death phase. This suggests the involvement of one or more factors that are either inactivated by the heat treatment or require active metabolism or bacterial growth. An advantage of this method is to allow parallel and easy measurement of cell death, ion leakage, and enzyme activities in a time-dependent manner. Thus, *Arabidopsis thaliana* suspension cells are an interesting model to discriminate between the effects of different virulence factors and, more generally, to analyze the virulence of *P. carotovorum*.

The virulence of different *P. carotovorum* strains (Supplemental Table 1) was compared with strain 132C by measuring the extent of cell death of *A. thaliana* suspension cells cocultured with these strains. When infected with  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>, exponential cell death occurred at different times, while an early induced cell death was detected only with strains 132C and 1351 (Fig. 2A). In this way, strain virulence was found to be as follows: strain 132C > 1351 > 1339 > 1349 = CFPB5980. The same sequence was observed after infection of *A. thaliana* cells with each strain at the rate of  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>, with cell death being delayed as expected for a QS regulation of the virulence (Fig. 2B). We further analyzed the pectate lyase activities of the culture medium upon coculture of *A. thaliana* cells with each *P. carotovorum* strain. As for strain 132C (Fig. 1C), pectate lyase activities were detected after a few hours of coculture (Fig. 3A). The appearance of these activities was correlated with the timing of the exponential cell death (Fig. 2A), thereby allowing us to propose the same sequence of virulence for the different strains: 132C > 1351 > 1339 > 1349 = CFPB5980. Cell electrolyte leakage during coculture with different strains was also delayed, but it was not perfectly synchronized with either exponential cell death or the increase in pectate lyase activities (Fig. 3B), although it gave the same sequence of virulence. Our comparisons indicate that all the strains are not able to induce an early limited cell death and that the timing of PCWDE secretion and subsequent large-scale cell death are variable and strain dependent. Furthermore, this method allows an easy comparison from a relatively large number of samples.

To evaluate the reliability of the data observed using *A. thaliana* suspension cells, the virulence of the different strains was evaluated with potato slices. Twelve potato slices (cv. Agatha) were infected with *P. carotovorum* strains, 132C, 1349, 1359, 1351, and CFPB5980 at  $10^2$ ,  $10^4$ , or  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>. The mean soft-rot diameters were measured after 24 h (Fig. 4). Infection of potato slices at the rate of  $10^2$  CFU·ml<sup>-1</sup> showed that the strains fell into the same order when comparing their



**Fig. 3. A,** Time course of pectinolytic activities measured in the culture medium during coculture of *Arabidopsis thaliana* cell after inoculation with various *Pectobacterium carotovorum* strains at the rate of  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>. **B,** Time course of electrolyte leakage increase in the culture medium during coculture of *A. thaliana* cell after inoculation with various *P. carotovorum* strains at  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Dashed lines with no symbols correspond to the data of strain 132C. Data represent the mean of three independent replicates and error bars correspond to standard errors.



**Fig. 4.** Mean values of soft-rot diameter caused by the different *Pectobacterium carotovorum* strains at  $10^2$ ,  $10^4$ , and  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Control with sterile distilled water did not induce symptoms. Triplicate potato slices in the same petri dishes were carried out as repeated treatments for each test, error bars correspond to standard errors. For each treatment, variable bar values with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range,  $P \leq 0.05$ .



action on cell death of *A. thaliana*—cultured cells, pectate lyase activities, and virulence on potato slices, i.e., 132C > 1351 > 1339 > 1349 = CFPB5980. Even if the differences between strains were not significant for infection at  $10^8$  and  $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup>, the general trends suggest the same sequence of virulence for the different strains (Fig. 4). Therefore, the cell-death data observed in *A. thaliana* cells are in accordance with the soft-rot symptoms found with infected potato slices. This cell death is representative of the bacterial virulence and, interestingly allows a precise evaluation of the virulence of different strains.

In conclusion, *A. thaliana* suspension cells are a reliable model to undertake a rapid testing of virulence diversity. Our data highlight the use of *A. thaliana* suspension cells as a tool to dissect the different events involved in *P. carotovorum* pathogenicity and to evaluate efficiently and rapidly the virulence of different strains.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial material.

Different strains of *P. carotovorum*, formerly *E. carotovora* subsp. *carotovora*, previously characterized by the Moroccan team, were used in this study and compared with the reference strain CFPB5980. All strains display the biochemical characteristics of *P. carotovorum*. PCR amplifications of total genomic DNA from all strains were positive with the primers Y1 and Y2, specific for *Pectobacterium* species (Darrasse et al. 1994) (amplified fragment of 434 bp), and they were negative with primers P143 and P145, specific for *Dickeya chrysanthemi* (El Hassouni et al. 1999). Strains were stored at -80°C. When required, each bacterial strain was cultured on LPGA agar medium (5 g yeast extract, 5 g peptone, 10 g glucose, and 16 g agar per liter, pH 7.2). Dead bacteria used for control were heat-killed at 100°C for 1 h.

### Plant material.

*Arabidopsis thaliana* L. (ecotype Columbia) suspension cells were grown at 24 ± 2°C, under continuous white light (40 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), with rotation shaking at 120 rpm in a 1-liter round-bottom flask containing 300 ml of Gamborg culture medium, pH 5.8. Cells were subcultured weekly by a 10-fold dilution in fresh medium (Bouizgarne et al. 2006; Errakhi et al. 2008).

### Quantification of cell death.

Cell viability was assayed using the vital dye Evans Blue (EB) (Errakhi et al. 2008). *A. thaliana* cell suspensions (500 μl) infected with different bacterial suspensions during different time periods were incubated for 10 min in EB to a final concentration of 0.001% in 0.1 M phosphate-buffer, pH 7. Cells that accumulated EB were considered dead. A total of 500 cells were counted for each infection.

### Measurement of electrolyte leakage.

Electrolyte leakage was measured from the clear supernatant of cultured cells infected with bacterial suspensions containing bacteria at  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup> that were incubated at 24 ± 2°C, under continuous white light (40 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), with rotation shaking in flasks containing 10 ml of solution. Conductivity was measured every 2 h with a SevenMulticonductimeter (Mettler Toledo, Viroflay, France).

### Pectate lyase assays.

Pectate lyase activities were measured by monitoring the unsaturated oligogalacturonates accumulated after the enzymatic cleavage of 0.5% (wt/vol) polygalacturonate (PGA). The assay was performed in 750 μl of substrate solution (0.5% PGA),

200 μl of clear supernatant of each treatment, 37.5 μl of  $5 \times 10^{-4}$  M CaCl<sub>2</sub>, and 512.5 μl of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. After incubation for 1 h at 30°C, the reaction was stopped by heating at 100°C for 20 min. Products resulting from sodium polypectate degradation were followed at 235 nm (Dinu et al. 2007; Pissavin et al. 1998).

### Pathogenicity test on potato slices.

Fresh potatoes (cv. Agatha) were washed and chopped into equal pieces with a sterile borer. *P. carotovorum* strains 132C, 1349, 1359, 1351, and CFPB5980 were cultured, and the concentrations were adjusted to  $10^2$ ,  $10^4$ , or  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Twelve potato slices were inoculated for each concentration. They were incubated at 30°C for 24 h, and the maceration areas were quantified.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. M. Pennarun for fruitful discussions and M. Hodges (IBP, Université Paris-Sud 11, Orsay, France) for carefully reading the manuscript. We also thank the editor and reviewers for fruitful comments. Financial support was provided by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to LEM-EA3514 and the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes to Programme de Recherche Agronomique pour le Développement 07-07.

## LITERATURE CITED

- Aittamaa, M., Somervuo, P., Pirhonen, M., Mattinen, L., Nissinen, R., Auvinen, P. and Valkonen, J. P. 2008. Distinguishing bacterial pathogens of potato using a genome wide microarray approach. *Mol. Plant Pathol.* 9:705-17.
- Atkinson, M. M., Baker, C. J., and Collmer A. 1986. Transient activation of plasmalemma K<sup>+</sup> efflux and H<sup>+</sup> influx in tobacco by a pectate lyase isozyme from *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.* 82:142-146.
- Barnard, A. M. L., and Salmond G. P. C. 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal. Bioanal. Chem.* 387:415-423.
- Barras, F., Van Gijsegem, F., Chatterjee, A. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Phytopathology* 32:201-234.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A. M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J. P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I., and Bouteau, F. 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: Toxic and signalling effects *New Phytol.* 169:209-218.
- Collmer, A. 1983. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Plant Physiol.* 71:118-121.
- Corbett, M., Virtue, S., Bell, K., Birch, P., Burr, T., Hyman, L., Lilley, K., Poock, S., Toth, I., and Salmond, G. 2005. Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:334-342.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1437-1443.
- Dinu, D., Nechifor, M. T., Stoian, G., Costache, M., and Dinischiotu, A. 2007. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J. Biotechnol.* 131:128-137.
- Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., and de Oliveira, A. M. R. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing black-leg of potato in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 96:535-545.
- Errakhi, R., Meimoun, P., Lehner, A., Vidal, G., Briand, J., Corbineau, F., Rona, J. P., and Bouteau, F. 2008. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J. Exp. Bot.* 59:3121-9.
- El Hassouni, M., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F., Barras, F. 1999. The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:887-892.
- Gross, D. C., Powelson, M. L., Regner, K. M., and Radamaker, G. K. 1991. A bacteriophage-typing system for surveying the diversity and distribution of strains of *Erwinia carotovora* in potato fields. *Phytopathology* 81:220-226.

- Helias, V., Le Roux, A. C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J. P., and Jouan, B. 2004. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:685-699.
- Holeva, M. C., Bell, K. S., Hyman, L. J., Avrova, A. O., Whisson, S. C., Birch, P. R., and Toth, I. K. 2004. Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:943-950.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:213-57.
- Kariola, T., Palomäki, T. A., Brader, G., and Palva, E. T. 2003. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia*-derived elicitors HrpN and PehA trigger distinct but interacting defense responses and cell death in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:179-187.
- Laasik, I., Andresen, L., and Mae, A. 2006. Type II quorum sensing regulates virulence in *Erwinia carotovora* ssp *carotovora*. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 258:227-234.
- Mäki-Vlákama, T., and Karjalainen, R. 2008. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. *Ann. Appl. Biol.* 125:301-309.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mäe, A., and Pirhonen, M. 2004. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1366-1375.
- Parent, J. G., Lacroix, M., Pagé, D., Vézina, L., and Végiard, S. 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plant by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Dis.* 80:494-499.
- Pemberton, C. L., Whitehead, N. A., Sebaihia, M., Bell, K. S., Hyman, L. J., Harris, S. J., Matlin, A. J., Robson, N. D., Birch, P. R., Carr, J. P., Toth, I. K., and Salmond, G. P. 2005. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: Identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:343-353.
- Perombelon, M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: An overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 51:1-12.
- Pissavin, C., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1998. Biochemical characterization of the pectate lyase PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Biochim. Biophys. Acta* 1383:188-196.
- Reboutier, D., and Bouteau, F. 2008. Harpins and ion channels modulations: Many ways to die. *Plant Signal Behav.* 3:314-316.
- Seo, S. T., Furuya, N., Lim, C. K., Takanami, Y., and Tsuchiya, K. 2002. Phenotypic and Genetic Diversity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia. *J. Phytopathol.* 150:120-127.
- Sledi, W., Jafra, S., Waleron, M., and Cojowska, E. 2000. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. *EPPO Bulletin* 30:403-407.
- Toth, I. K., Pritchard, L., and Birch, P. R. 2006. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:305-36.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., van der Heijden, W. H. W., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2008. Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1609-1621.
- Yap, M. N., Barak, J. D., and Charkowski, A. O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3013-3023.

**Supplementary Table 1.** Biochemical, physiological and molecular characteristics of the *Pectobacterium carotovorum* strains

Strains	132C	1349	1339	1351
<b>Microbiological tests</b>				
Staining Gram	–	–	–	–
Catalase activity	+	+	+	+
Oxidase activity	–	–	–	–
Pectinolytic activity	+	+	+	+
Fermentation/oxidation	+/+	+/+	+/+	+/+
Gelatine degradation	+	–	+	+
Pigment production	–	–	–	–
Nitrates reduction	+	+	+	+
<b>Pathogenicity tests</b>				
Slices of potato	+	+	+	+
leaves of tobacco	+	+	+	+
<b>Biochemical tests</b>				
Lecithinase activity	–	–	–	–
Indole production	–	–	–	–
Acid production from:				
Lactose	+	+	+	+
Trehalose		+	+	+
$\alpha$ -Methyl glucoside	–	–	–	–
D-arabitol		–	–	–
Sorbitol	–	–	–	–
	+	+	+	+
Reducing substances from sucrose	–	–	–	–
Growth at 37°C	–	–	–	–
<b>Molecular tests</b>				
primers Y1/Y2	+	+	+	+
primers P143/P145	–	–	–	–



# **CHAPITRE 4**

## *Diversité de réponses cellulaires aux LPS chez des cellules d'Arabidopsis thaliana en suspension*

## Chapitre 4. Diversité de réponses cellulaires aux LPS chez des cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension

### 1. Présentation

Le lipopolysaccharide (LPS) est une macromolécule de surface majoritaire des bactéries Gram négatif (chap. 1, figure 7). Il participe à la protection physique des cellules bactériennes en contribuant à réduire la perméabilité membranaire, permettant ainsi la croissance bactérienne dans un environnement défavorable. Etant présent chez toutes les bactéries gram négatif, il constitue un motif conservé, ou MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns), qui est impliquée dans les phénomènes de reconnaissance par les autres organismes conduisant à l'induction de l'immunité innée. Chez les plantes, en réponse aux LPS les principales réponses décrites sont le burst oxydatif (chap.1, § 3.3.5), la production de NO (chap.1, § 3.3.6), l'influx de calcium (chap.1, § 3.3.3), l'alcalinisation du milieu extracellulaire (chap.1, § 3.3.2), l'induction des gènes PR (chap.1, § 3.3.7) et l'inhibition de la réponse hypersensible (chap.1, § 3.3.8) (Erbs et Newman, 2012).

Toutefois, ces événements moléculaires et cellulaires sont généralement associés à l'initiation de la HR, une forme de mort cellulaire programmée (PCD) (Heath, 2000) et les effets observés semblent dépendant de l'origine du LPS, de l'espèce végétale voir du type cellulaire (Erbs et al. 2010). Notre objectif pour le travail présenté dans ce chapitre était d'étudier l'éventuelle diversité des effets induits par les LPS extraits de bactéries non phytopathogènes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) comparés à ceux des LPS des bactéries phytopathogènes (*Pectobacterium carotovorum carotovorum* et de *Pectobacterium atrosepticum*) sur le modèle de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*. le modèle dont nous avons démontré qu'il consistait en un système fiable d'analyse de la diversité d'agressivité de ces bactéries (chapitre 3). Pour cela nous avons recherché l'impact de ces différents LPS sur des réponses rapides et tardives connues pour être modulées par les LPS. Nous avons utilisé pour cela des techniques de voltage imposé à électrode pour les mesures d'activité des canaux ioniques (annexe 3), de luminométrie pour les mesures de formes actives d'oxygènes (ROS), et de variations du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (annexes 4), d'ionométrie pour les mesures des variations du pH extracellulaire, RT-PCR pour les mesures d'induction

des transcripts correspondant aux gènes de défense et de coloration vitale pour la mise en évidence de la PCD. Ces techniques ont été couplées à des approches pharmacologiques permettant de moduler spécifiquement les différentes voies impliquées. Nos résultats mettent en évidence des réponses de défense communes et d'autres spécifiques aux différents types de LPS, indiquant ainsi que différentes voies de signalisation pourraient être activées chez *Arabidopsis thaliana*. Ce travail est présenté dans l'article 1 actuellement en cours d'évaluation.

Les réponses de défense spécifiques observées chez les deux types de LPS, nous ont amenés à comparer leur efficacité de protection contre le *Pectobacterium carotovorum* chez les cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* et chez la pomme de terre. Nos données suggèrent que suivant l'origine des LPS (de bactéries pathogènes ou de non pathogènes), la durée de mise en place de la protection peut varier. Elles confirment également, qu'un prétraitement par les LPS peut protéger au moins partiellement les cellules végétales d'une agression par une bactérie phytopathogène, probablement en déclenchant des réponses d'immunité innée chez la plante. Ce travail a été publié dans la revue « Moroccan journal of plant protection » de l'Association Marocaine de protection des plantes (AMPP). (article 2 de ce chapitre).

## 2. Méthodologie expérimentale

Protocole expérimental de détection de niveau d'agressivité des souches de *Pectobacterium carotovorum*. (Voir annexes 3 et 4).

## 3. Article 4.1

**Titre en français :** Réponses rapides communes et différenciées des cellules d'*Arabidopsis thaliana* aux lipopolysaccharides de bactéries pathogènes et non pathogènes.

**Mohamed Kettani-Halabi**, Daniel Tran, Aurélien Dauphin, Rafik Errakhi, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, François Bouteau

#### 4. Article 4.2

**Titre en français :** Les lipopolysaccharides, biostimulants pour la protection de la pomme de terre contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

**Mohamed Kettani-Halabi**, Mohamed Amdan, Meriem Terta, Daniel Tran, Amine Yekkour, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, François Bouteau.

### Article n°3

---

*Early common and differential responses of Arabidopsis thaliana cells to lipopolysaccharides from pathogenic and non-pathogenic bacteria*

**Mohamed Kettani-Halabi**, Daniel Tran, Aurélien Dauphin, Rafik Errakhi, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, François Bouteau

Submitted in Journal of Experimental Botany



## **Early common and differential responses of *Arabidopsis thaliana* cells to lipopolysaccharides from pathogenic and non-pathogenic bacteria**

Kettani-Halabi Mohamed<sup>1,2</sup>, Tran Daniel<sup>1</sup>, Dauphin Aurélien<sup>3</sup>, Errakhi Rafik<sup>1</sup>, Val Florence<sup>4</sup>,  
Ennaji Moulay Mustapha<sup>2</sup>, Bouteau François<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Diderot-Paris 7, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes, Institut de Biologie des Plantes, Bât. 630, 91405 Orsay cedex, France

<sup>2</sup>LVHM–Université Hassan II Mohammedia – Casablanca, FSTM, Maroc

<sup>3</sup>UPMC, UMR-S975, Plateforme d'Imagerie cellulaire Pitié-Salpêtrière, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France

<sup>4</sup> AGROCAMPUS OUEST, UMR1349 IGEPP, F-35000 Rennes, France.

Corresponding author: François Bouteau

Address: Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes, Institut de Biologie des Plantes,  
Bât. 630, 91405 Orsay cedex, France.

Tel: 33 (0)1 69 15 33 99, Fax: 33 (0)1 69 15 34 24

E-mail: francois.bouteau@univ-paris-diderot.fr

## Abstract

Lipopolysaccharides (LPS) are a component of the outer cell surface of almost all Gram-negative bacteria and play an essential role for bacterial growth and survival. Lipopolysaccharides represent typical MAMPs molecules and have been reported to induce defense-related responses, including the expression of defense genes and the suppression of the hypersensitive response in plants. However, depending on their origin and the challenged plant, LPS could have complex and different roles. Our data confirm that LPS preparations from plant pathogens *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and non-pathogens *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* can induce a set of common plant defense responses in *Arabidopsis* cells, including reactive oxygen species (ROS) generation and defense gene expression. However, we also provide evidence that *Arabidopsis* cells display specific responses to both types of LPS indicating that different signaling pathways could be activated. Among the LPS-induced responses the differential kinetic and amplitude in ROS generation seemed to be determinant to induce *Arabidopsis* cultured cells programmed cell death.

**Key words:** Defense responses, Lipopolysaccharides (LPS), ROS, programmed cell death, plant pathogen, *Pectobacterium* sp, *Arabidopsis thaliana*.

**Abbreviations:** ROS, reactive oxygen species; PCD, programmed cell death; LPS, lipopolysaccharides, OPS, O-polysaccharide part; ETI, effector-triggered immunity; PTI, PAMP triggered immunity; AD, actinomycin D; Chx, cycloheximide; EB, Evans Blue; HR, hypersensitive response; DPI, diphenylene iodonium; Tiron, sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate

## **Introduction**

In the environment, plants are constantly challenged by potential pathogenic microorganisms. The phytopathogenic bacteria can either lead to diseases, which may cause great economic losses in crops or to a rapid activation of plant defense responses that contain or eliminate the pathogen (Newman et al., 2007). Activation of plant cell defenses occurred after perception of conserved microbe-specific molecules, referred to microbe or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs or PAMPs). These plant reactions constitute the PAMP triggered immunity (PTI) (Boller and Felix, 2009; Zhang and Zhou, 2010). To counteract PTI, pathogens adapted to their host plants have to deliver virulence effector into host cells and induce the effector triggered susceptibility (ETS) (Abramovitch et al., 2006). But, plants have evolved resistance proteins, to detect some of the effector protein activities and trigger disease resistance, named effector-triggered immunity (ETI). This original model was described by John and Dangl (2006). It is noteworthy that signaling network and defense gene expression largely overlap during PTI and ETI (Navarro et al., 2004; Tsuda et al., 2009).

MAMPs such as lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans, lipoteichoic acid, eubacterial flagellin, harpin, elongation factor Ef-Tu and unmethylated bacterial DNA fragments, are able to trigger PTI in various plant species (Nürnberger and Lipka, 2005; Zipfel and Felix, 2005; Erbs et al., 2008; Gerber et al., 2008). Among MAMPs, LPS are major amphiphilic cell surface components of the outer cell surface of Gram-negative bacteria. They play a major role for bacterial growth and survival (Evans et al., 2010). Structurally, LPS is a glycoconjugate, tripartite molecule, consisting of a hydrophobic lipid part (lipid A), a core oligosaccharide and an O-polysaccharide part (OPS) (Erbs et al. 2010). Although, recognition of some MAMPs seemed to occur through pattern recognition receptors (Boller and Felix, 2009; Zhang and Zhou, 2010), the LPS recognition in plants remains little-known (Erbs and Newman, 2012). Nevertheless, LPS from different bacteria species can trigger or potentiate PTI and several studies show its implication into the mechanism of plant defense activation (Conebtry and Duberry 2001; Gerber et al. 2004; Gerber and Dubery, 2004; Zeidler et al., 2004; Sanabria and Dubery, 2006, Livaja et al. 2008). Lipopolysaccharides has been reported to induce an oxidative burst, NO production, calcium influx, alkalization of the extracellular medium, pathogenesis related (PR) gene expression and cell wall alterations that include the deposition of callose and phenolics (Erbs and Newman, 2012). These molecular and cellular

events are frequently associated with the initiation of the hypersensitive response (HR), a form of programmed cell death (PCD) (Heath, 2000). However, one of the effects of LPS described on plants is their ability to prevent HR in leaves (Erbs and Newman, 2003). As discussed by Erbs et al. (2012), these findings present a conundrum since both, basal resistance responses and HR, are supposed to contribute to plant defense. Moreover, if LPS induced PCD was never reported in dicots (Erbs et al., 2010), it could induce PCD in monocots such as rice cells (Desaki et al., 2006).

The LPS from the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) seems to be crucial not only for optimal growth and survival of the bacteria but for its virulence as well (Evans et al., 2010) and was shown to induce different early responses such as acidification of the medium (Desender et al., 2006). Variations in LPS induced responses can be attributed to the various LPS preparations, various plants and cell types used and reflect the ability of particular plants to recognize structural features within LPS that are not widely conserved (Erbs and Newman, 2012). This is reminiscent of what was observed in animal models, since LPS administration could stimulate immune activation, inflammation and PCD (Aballay et al., 2003; Nolan et al., 2003; Becerra et al., 2011), but also, depending on model and cell type; act as mechanisms of protection preventing cell death (Kramer et al., 2002), or virulence factors by favoring the escape from the innate immune system (Lapaque et al., 2006). Thus, LPS could have complex and different roles in plant as well as in animal.

In this study, using *A. thaliana* cell suspensions as a host model system (Mole et al., 2010; Terta et al., 2010), we compared the effects of LPS from Gram-negative phytopathogenic bacteria ie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) and *Pa*, and non-phytopathogenic bacteria ie *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, on early cellular responses classically associated to defense responses and PCD. We found that pathogenic and non-pathogenic LPS share some defense responses, but only LPS from pathogenic bacteria could induce a PCD depending on an early ROS production.

## **Materiel and Methods**

### **Cell culture conditions**

*A. thaliana* L. (ecotype Columbia) cells were cultured at  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , under continuous white light ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) with continuous rotation shaking (gyratory shaker) at 120 rpm, in a 1 L round bottom flask containing 300 mL Gamborg culture medium at pH 5,8 supplemented with  $30\text{g.L}^{-1}$  sucrose and with  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (Bouizgarne et al. 2006). Cells were transferred to fresh medium every 7 days by a 1/10 dilution. The experiments were conducted using the cells in log-phase (4 days after sub-culturing).

### **Lipopolysaccharides extraction and purification**

LPS from *Pseudomonas aeruginosa* (LPS<sub>P.aeruginosa</sub>) serotype 10 and LPS from *E. coli* (LPS<sub>E.coli</sub>) serotype O111:B4 were purchased from Sigma. LPS from *Pa* (LPS<sub>Pa</sub>) and *Pcc* (LPS<sub>Pcc</sub>) were extracted using the hot phenol-water method of Westphal & Jann (1965) with some modifications as described by Desender et al. (2006).

### **Cell death quantification**

Cell viability was assayed using the vital dye Evans Blue (EB) (Terta et al., 2010). An *A. thaliana* cell suspension was incubated (24h) in their culture medium in the presence of LPS with or without the appropriate pharmacological effectors. Then, cells (500  $\mu\text{L}$ ) were incubated for 10 min in 1 ml phosphate buffer (0.1 M - pH 7) supplemented with Evans Blue to a final concentration of 0.001%. Cells that accumulate Evans Blue were considered dead. At least 500 cells were counted for each independent treatment and repeated at least 3 times for each condition.

### **Detection and quantification of reactive oxygen species in the culture medium**

For confocal laser-scanning microscopy, 500  $\mu\text{L}$  of cell suspension was treated or not with  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  LPS and 15 min before observation with 5  $\mu\text{M}$  5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA – Invitrogen) a probe allowing ROS detection (Setsukinai et al., 2003). All samples were placed between slide and

cover slip and imaged using an oil immersion objective (40X, N.A. 1.25) on a Leica SP2 AOBs AOTF confocal microscope from the local imaging facility (Plate-forme d'Imagerie Cellulaire de la Pitié-Salpêtrière – PICPS). Images were analyzed using Leica Confocal Software.

Quantification of ROS in the culture medium was performed by measuring the chemiluminescence of luminol reacting with ROS (Bouizgarne et al. 2006). *Arabidopsis thaliana* cell suspension was inoculated with LPS alone or with the appropriate chemical effectors. Before each measurement, 200  $\mu$ L of the cell culture was added prior to 5  $\mu$ L luminol 1.1 mM addition. Chemiluminescence measurements were carried out at 30 min intervals using a FB12-Berthold luminometer (signal integrating time 0.2 s).

### Extracellular pH measurements

Extracellular pH was measured directly in the medium (Meimoun et al., 2009). The experiments were run simultaneously in 7 x 5 mL flasks (control and tests) each containing 2 mL of suspension cells under continuous shaking. Simultaneous changes in pH were measured by using ELIT 808 ionometer with pH sensitive combined electrodes functioning in parallel. Data are expressed as upH and are means  $\pm$  SE.

### RT-PCR analysis of gene expression

Four-day-old cells were treated with 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> LPS, harvested and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was quantified on a NanoDrop Spectrophotometer and their integrity was checked on denaturing agarose gel. Total RNA (2  $\mu$ g) was converted into first-strand cDNA with the Superscript<sup>TM</sup> II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) primers. cDNA samples were diluted 100-fold and 1  $\mu$ L of dilution was amplified in 25  $\mu$ L of PCR mixture with gene-specific primers for *PR1*, *PAL1* and *EF1 $\alpha$ A4* (Table 1) used as the housekeeping gene. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles for *PR1* and *PAL1* or 26 cycles for *EF1 $\alpha$ A4* of 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 1 min 30 s, and ending with

72°C for 10 min. PCR products were separated by gel electrophoresis (1.8%) and visualized by SYBR® Safe stain (Invitrogen). All the primer combinations used were tested on genomic DNA from *A. thaliana*. Representative results from two independent experiments are shown.

**Table 1. Primers used for semi-quantitative RT-PCR analyses.**

Gene name	Accession no.	Primers used
<b><i>PAL1</i></b>	NM_129260.2	F, 5'-CGGAGGAGGAGTGGACGCTAT-3' R, 5'-TGCGACACCGTTTTTGGTTCT-3'
<b><i>PR1</i></b>	NM_127025.2	F, 5'-CTGGCTATTCTCGATTTTAAATCG-3' R, 5'-TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG-3'
<b><i>EF1αA4</i></b>	NM_001125992.1	F, 5'-ATGCCCCAGGACATCGTGATTTCA-3' R, 5'-TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA-3'

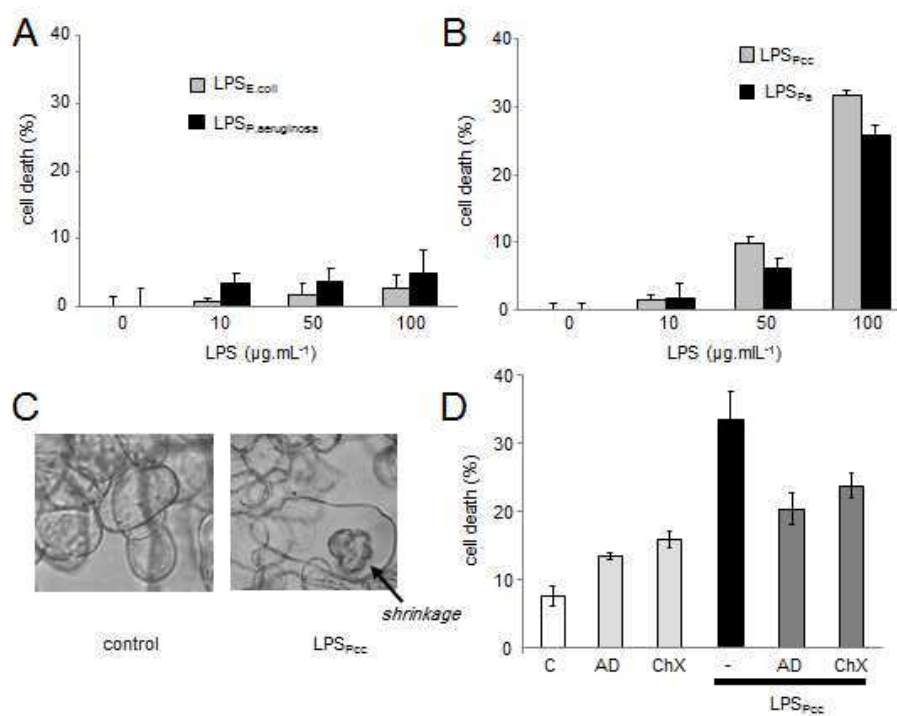
#### Post-LPS phytochemical challenge on *A. thaliana* cells

*Arabidopsis* cells (1 mL) were pretreated or not with 100 µg.mL<sup>-1</sup> of LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>P.aeruginosa</sub> for 14h and then inoculated with 100 µL of *Pectobacterium carotovorum* (CFBP 5890, INRA Angers, France) at 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Cell viability was monitored after 24h as described above.

## Results

### Pathogenic LPS from *Pectobacterium* sp. induces cell death in *Arabidopsis thaliana* cells

We first tested the effect of the various LPS on cell death. LPS from the non-phytopathogenic bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* did not induce cell death of *Arabidopsis* cultured cells (Fig. 1A). These results are in accordance with previous data obtained by Desaki et al (2006). Conversely, LPS from the plant pathogenic *Pcc* and *Pa* induced a dose dependent cell death, evaluated by Evans blue staining of the cells (Fig. 1B). About ten percent of cells were dead 24h after addition of 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>Pa</sub> and more than thirty percent of the cells were dead at 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , thus in the range of LPS concentration known to elicit defense responses in different plants (Erbs and Newman, 2012).



**Figure 1. Effect of LPS from various bacteria on cell viability of *A. thaliana* cultured cells.**

Effect of increasing concentrations of LPS (0 to 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) from non-phytopathogenic (A), or phytopathogenic bacteria (B) on *Arabidopsis* cell death after 24 h of treatment. C. LPS<sub>Pcc</sub> induced cell shrinkage of *Arabidopsis* cells treated with 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  during 24h. D. Effect of pretreatment with, actinomycin D (AD, 20  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) or cycloheximide (Chx, 20  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) on cell death induced by 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  LPS<sub>Pcc</sub>. C corresponds to the control cells without treatment. Data reflects the mean and standard errors (SE) of three independent experiments.



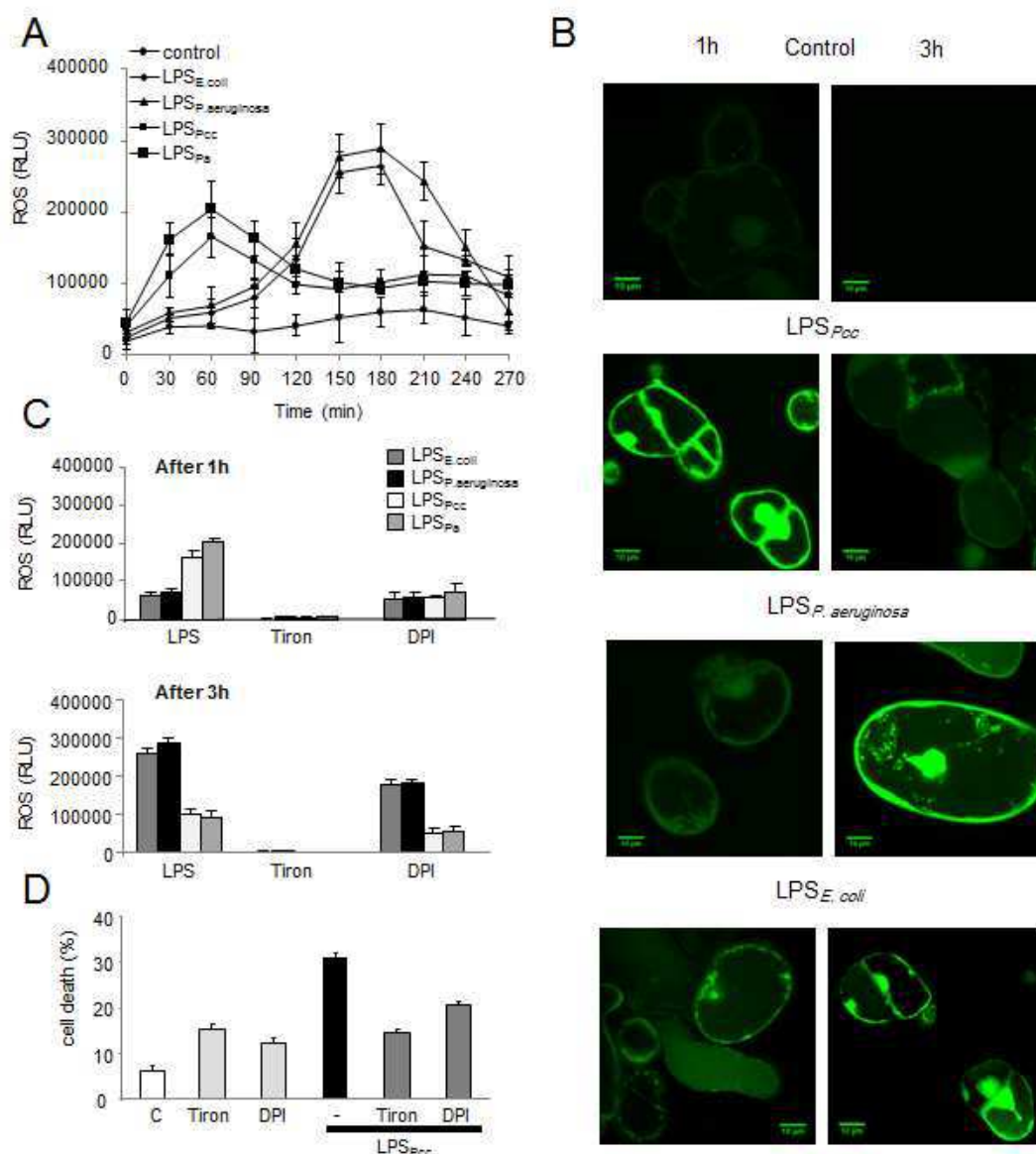
This cell death was accompanied by cell shrinkage (Fig. 1C), a hallmark of programmed cell death (Van Doorn, 2011). In order to check whether LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death was due to an active mechanism requiring active gene expression and cellular metabolism, *A. thaliana* cells were pretreated with actinomycin D (AD), an inhibitor of RNA synthesis, or with cycloheximide (Chx), an inhibitor of protein synthesis, at 20 mg.mL<sup>-1</sup> each. Although AD and Chx induced a slight cell death by themselves, these both inhibitors reduced the LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death (Fig. 1D). These results suggest that LPS from the plant pathogenic bacteria could induce a PCD in *Arabidopsis thaliana* cells.

### **LPS induced generation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cells**

Various LPS were shown to induce ROS in plant (Desaki et al., 2006; Erbs and Newman, 2012). We have therefore tested if pathogenic and non-pathogenic LPS could induce ROS generation. Pathogenic LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>Pa</sub> induced an increase in luminol-mediated chemiluminescence caused by ROS release into the culture medium (Fig 2A) within 30 min after the addition of 100 µg mL<sup>-1</sup> LPS. The ROS concentration of the culture medium reached a maximum at 1h, then decreased till 3h (Fig. 2A). This kinetic was compared in timing and magnitude with the LPS from plant non-pathogens, LPS<sub>E. coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. A strong production of ROS started after approximately 2h, reached a peak around 3h and decreased to a level similar to that of the control in 2h (Fig. 2A). The non-pathogenic LPS induced ROS increases at 3h were more important than those induced by pathogenic LPS at 1h (Fig 2A).

The CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence was used to confirm the accumulation of ROS in *A. thaliana* cells in response to LPS<sub>Pcc</sub>, LPS<sub>E.coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> (Fig. 2B). Increase of ROS could be observed in the cytosol and nucleus with all the LPS tested. But LPS<sub>Pcc</sub> induced a peak of ROS after 1h and decreased at 3h while for LPS<sub>E.coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> the ROS level was maximal at 3h (Fig. 2B).

Pretreatment of the cells with Tiron (5 mM), a scavenger of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, completely abolished the LPS induced luminol chemiluminescence, for pathogenic at 1h and non-pathogenic LPS at 3h (Fig. 2C,D). Also at a lesser extent, diphenyleneiodonium chloride (DPI, 50 µM), an inhibitor of the NADPH-oxidase, also decrease ROS level induced by both type of LPS (Fig. 2C), suggesting that NADPH-oxidases participate towards the ROS generation.



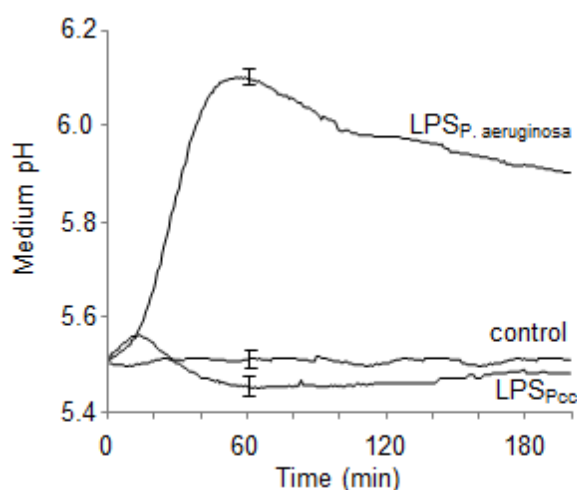
**Figure 2. Production of reactive oxygen species (ROS) by *A. thaliana* cultured cells in response to LPS from various bacteria.**

(A) Kinetics of ROS generation in the medium of cells treated by LPS molecules derived from *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc) and *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) for the plant pathogens, and *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* for the non-phytopathogenic bacteria. (B) Imaging of ROS accumulation *Arabidopsis* cells treated with pathogenic or non-pathogenic LPS after 1h (left) or 3h (right). Green fluorescence is indicative for ROS (Scale bars, 10  $\mu$ m). (C) Effects of Tiron (5 mM), a scavenger of superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ); or diphenyleneiodonium (DPI, 50  $\mu$ M), an inhibitor of the NADPH oxidase, after 1h (C1) and 3h (C2) on the production of ROS by *Arabidopsis* cells. (D) Effect of pretreatment with Tiron (5 mM) or DPI (50  $\mu$ M) on cell death induced by 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> LPS<sub>Pcc</sub>. Data reflects the mean and standard errors (SE) of at least three independent experiments.

Since ROS release may cause PCD (Hoeberichts and Woltering, 2003), we further checked if the pretreatment of *A. thaliana* cells with Tiron or with DPI could impact the LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death. Tiron and DPI alone both induced a slight increase in cell death (Fig. 2D). However, the LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death significantly decreased after these pretreatments (Fig. 2D), indicating that the generation of ROS induced by LPS<sub>Pcc</sub> is probably an upstream event in the signaling pathway leading to LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death.

### Non pathogenic LPS induced alkalization of the medium

Alkalization of the external medium is recognized as a classical response to PAMPs and various LPS were shown to alkalize the medium of cell cultures (Gerber et al., 2004; Erbs et al., 2010). We then investigated the effect of LPS from pathogenic and non-pathogenic bacteria on external pH modification. Time courses of the pH of the culture medium of *A. thaliana* cells were monitored in presence of LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> (Fig. 3). The alkalization of medium upon addition of 100 µg LPS<sub>P.aeruginosa</sub> reached a maximum after 1h, about 0.6 upH compared to the control. In the same manner, LPS<sub>Pcc</sub> induced an acidification of medium but the variation in pH upon 3h was less than 0.1 upH, suggesting that differential perception of pathogenic and non-pathogenic LPS by *A. thaliana* cells occurred.



**Figure 3. Variations in the pH medium of *A. thaliana* cultured cells elicited by 100 µg.mL<sup>-1</sup> LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>P.aeruginosa</sub>.**

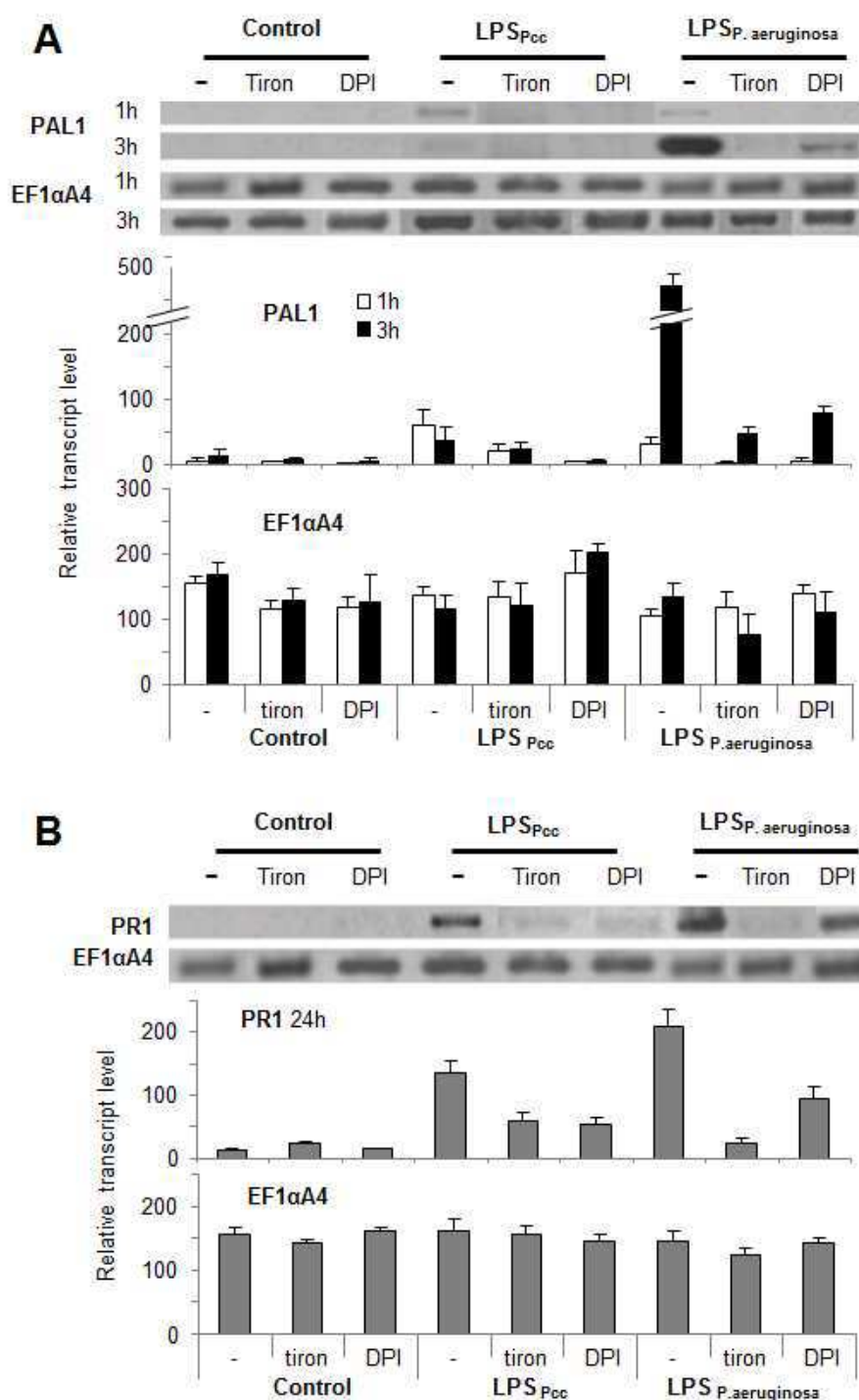
Data reflects the mean and standard errors (SE) of three independent experiments.

### **LPS induced gene transcription in *Arabidopsis thaliana* cells**

Defense responses of plants to pathogens or pathogen-derived molecules comprising LPS becomes also apparent in induction of genes defense (Zeidler et al., 2004; Zipfel et al., 2004), including PAL (phenyl ammonia-lyase) gene (Van Loon et al., 2008) and PR (pathogenesis-related) genes (Erbs et al., 2010). We have therefore evaluated by RT-PCR mRNA accumulation for the PAL1 and PR1 in response to LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> in our model. In response to LPS<sub>Pcc</sub>, an increase in expression of PAL1, although weak, was observed 1h after elicitation (Fig. 4A). The expression of PAL1 in response to LPS<sub>P.aeruginosa</sub> was largely increased after 3h (Fig. 4A). The increase in PAL1 expression seemed to be synchronized with the ROS generation, since maximal level of PAL1 expression occurred at the same time that the maximal ROS generation, i.e. 1h after treatment by LPS<sub>Pcc</sub> and 3h after LPS<sub>P.aeruginosa</sub> treatment respectively (Fig. 2A, B).

We thus performed pretreatment of the cells with Tiron (5 mM) and DPI (50  $\mu$ M), efficient to decrease LPS induced ROS generation (Fig. 2C) before LPS treatments and searched for PAL1 transcription. This pharmacology effectively allowed counteracting the PAL1 transcription observed with LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>P.aeruginosa</sub> (Fig. 4A), strongly suggesting that ROS generation were involved in PAL1 transcript up-regulation.

Concerning PR1 genes, its expression was only induced 24h after elicitation whatever the LPS used (Fig 4B). These increases in PR1 expression were also reduced upon pretreatment of the cells with Tiron (5mM) and DPI (50 $\mu$ M) suggesting that ROS generation were also involved in the delayed signaling pathway(s) leading to PR1 transcript up-regulation.

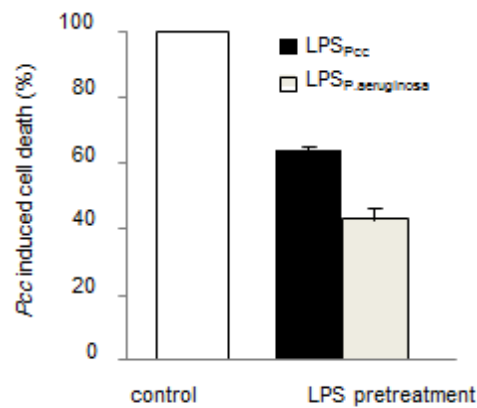


**Figure 4. Effect of LPS on defense-related gene expression in *A. thaliana* cells.**

**A.** Effect of pathogenic LPS<sub>Pcc</sub> and non-pathogenic LPS<sub>P.aeruginosa</sub> at 100 µg.mL<sup>-1</sup> on expression of PAL1 (encoding phenylalanine ammonia-lyase), and **B.** PR1 (pathogenesis-related protein 1) with or without Tiron (5 mM), or DPI (50 µM). The EF1αA4 gene was used as a housekeeping gene. Relative transcript levels were based on signal intensity analyzed with ImageJ, expression level of EF1αA4 gene being used for calibration (= 100). Data reflects the mean and standard errors (SE) of two independent experiments.

### Pathogenic and non-pathogenic LPS could antagonize *Pcc*-induced death of *A. thaliana* cells

One of the effects of LPS described on plants is their ability to prevent HR a form of PCD (Erbs and Newman, 2003). Pathogenic LPS were also shown to decrease *Pcc* induced soft rot symptoms on potato tubers (Val et al., 2006). As we recently showed that *Arabidopsis* cells could serve as a model to analyzed *Pcc* virulence (Terta et al., 2010), we checked if pretreatment with pathogenic as pathogenic LPS could counteract the *Pcc* induced cell death. As we previously reported (Terta et al., 2010), the rate of *Arabidopsis* cell death after 24h treatment by of a  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> *Pcc* (CFBP5980) was 100% (Fig 5). A reduction in cell death caused by *Pcc* of more than 50% was observed when these cells were pretreated 14h before inoculation with 100 µg.mL<sup>-1</sup> LPS<sub>*P.aeruginosa*</sub> (Fig. 5). Pretreatment of cells with 100 µg.mL<sup>-1</sup> LPS<sub>*Pcc*</sub> during 14h before inoculation the *Pcc* were less efficient (Fig. 5).



**Figure 5. Effect of 14h of pretreatment with 100 µg.mL<sup>-1</sup> LPS<sub>*Pcc*</sub> and LPS<sub>*P. aeruginosa*</sub> on cell death induced by CFBP 5890 on *A. thaliana* cells after 24h.**

Data reflects the mean and standard errors (SE) of three independent experiments.

## Discussion

In our present study, we showed that purified LPS from pathogenic *P. atrosepticum* and *P. carotovorum carotovorum* as well as LPS from non-pathogenic *P. aeruginosa* and *E. coli* could induce in *Arabidopsis* cell suspensions cellular events classically associated with defense responses as reported in numerous studies (Gerber and Dubery, 2004; Zeidler et al., 2004; Sanabria and Dubery, 2006). However, some of the responses seemed to be specific to pathogenic (eg. PCD) or non-pathogenic (eg. medium alkalization) LPS, when other shared responses (eg ROS generation, up-regulation of gene transcription) could present variable kinetics and amplitudes depending on the origin of the LPS used.

Among the shared responses, ROS generation was recorded in *Arabidopsis* cells upon treatment with 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of the pathogenic LPS<sub>Pa</sub> and LPS<sub>Pcc</sub> and the non-pathogenic LPS<sub>E.coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Although, the evidence available on the oxidative burst in response to elicitation by LPS are dependent on the plant species and the origin of the LPS, since it did not induced systematically an oxidative burst (Dow et al., 2000; Meyer et al., 2001; Desender et al., 2006), our data are in accordance with previous studies showing that various LPS preparations could induce ROS generation in different plants (Gerber et al., 2004; Desaki et al., 2006; Erbs and Newman, 2012). In our experiments, addition of DPI before elicitation did alter the ROS generation by pathogenic and non-pathogenic LPS, pointing out to a NADPHoxidase-dependent pathway. However, among the LPS preparations, those derived from the plant pathogenic bacteria *Pa* and *Pcc* showed weaker ROS-inducing compared to non-pathogenic LPS preparations, as previously described in rice cell culture (Desaki et al. 2006). Moreover, the kinetics of ROS generation were different, pathogenic LPS-induced peaking 1h after treatment, thus 2 hours before the one induced by non-pathogenic LPS.

Another shared defense responses between the non-pathogenic and pathogenic LPS we tested, was the induction of PAL1 transcripts. This gene encodes for phenyl ammonia-lyase, a key enzyme in the phenylpropanoid biosynthetic pathway (Dixon, 2001) known to participate in the induction of defense by modulating the synthesis of cell wall component and defense related compounds as already observed with some LPS (Erbs et al., 2010). Interestingly, the induction of PAL1 transcript seemed to be correlated with the LPS-induced ROS generation, since PAL1 transcription after treatment with pathogenic LPS<sub>Pcc</sub> were more important at 1h

than at 3h on the opposite of what observed with non-pathogenic LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Moreover, as observed for ROS generation, the transcript levels were weaker with LPS<sub>Pcc</sub> when compared to LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Tiron, a scavenger of ROS, as well as DPI were able to decrease ROS generation and the LPS-induced PAL1 transcription, whatever the LPS tested. This suggests a common pathway involving ROS generation to achieve PAL1 transcription, however the different kinetics of ROS generation suggest the ability of *Arabidopsis* cells to display specific responses depending on the nature of LPS.

The PR1 transcription was up-regulated in our cells by pathogenic and non-pathogenic LPS, but only 24h after, as already observed by Silipo et al. (2008) with the lipid A part of LPS of *X. campestris*. This up-regulation was also ROS dependent and the level of transcript induced by LPS<sub>Pcc</sub> was weaker than the LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Zeidler et al. (2004) showed that LPS could activate an earlier transcription of PR1 in *Arabidopsis*. However, conflict in results was already reported depending on the different plant systems (cell cultures vs. the whole plant) and/or the origin of the LPS (Erbs et al., 2010).

Ion fluxes, especially early Ca<sup>2+</sup> influx, are frequently associated with response to microbe derived molecules (Lecourieux et al., 2006) and notably LPS (Gerber et al., 2004; Ali et al., 2007). However, using *Arabidopsis* cell expressing aequorin, we failed to detect any modification in cytosolic Ca<sup>2+</sup> level in response to pathogenic and non-pathogenic LPS (supplemental figure 1). We further could not provide direct electrophysiological evidence that LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> could induce differential early ion flux regulations in response to pathogenic and non-pathogenic LPS (supplemental figure 2). On the contrary, addition of the non-pathogenic LPS<sub>P.aeruginosa</sub> caused a strong alkalization of *Arabidopsis* cell extracellular medium within 30 min when the pathogenic LPS<sub>Pcc</sub> induced only weak variation of pH. The alkalization of extracellular medium induced by LPS<sub>P.aeruginosa</sub> could not be related to consumption of H<sup>+</sup> for production of reactive oxygen species since these latter generation recorded in response to this LPS occurs after 90 min, thus largely after the peak of alkalization observed. Such alkalization in response to LPS from *Burkholderia cepacia* was already reported in tobacco cell culture (Gerber et al., 2004). However, the pathogenic LPS<sub>Pa</sub> was reported to induce acidification of the extracellular medium of tomato culture cells when it failed to acidify potato extracellular medium (Desender et al., 2006). The differential response to LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> is a supplemental indication on the ability of *Arabidopsis*



cells to display specific outcomes in response to the type of LPS. This difference is probably mediated by recognition of structural features within LPS that are not necessarily conserved between pathogenic and non-pathogenic LPS.

As a matter of fact, only pathogenic LPS<sub>Pcc</sub> and LPS<sub>Pa</sub> were able to induce a dose dependent death on a part of the cell population, when non-pathogenic LPS<sub>E.coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> did not. The extent of this cell death was in the same order of magnitude to those observed in response to various harpins, another type of PAMPs (Nürnberg et al. 2004) in *Arabidopsis* cultured cells (Krause and Durner, 2004; Reboutier et al., 2007). This cell death was accompanied by cell shrinkage and needs an active metabolism as ascertain by its reduction by inhibitors of transcription and translation; thus displaying widely accepted hallmarks of PCD (Van Doorn, 2011). LPS-induced PCD was already reported in rice cultured cells (Desaki et al., 2006) but non-pathogenic LPS<sub>E.coli</sub> and LPS<sub>P.aeruginosa</sub> were shown to induce PCD in this model. Our data are also reminiscent of the LPS-induced ROS-mediated endothelial cell death observed in animal (Becerra et al., 2011), since in our model, inhibition of ROS generation by DPI or Tiron allowed a significant decrease of the LPS<sub>Pcc</sub>-induced cell death. It seemed thus that the early ROS generation observed in response to pathogenic LPS could participate in, at least, two signaling pathways, one leading to PCD and another one leading to regulation of gene transcription. The time course of ROS generation seemed to be a key difference to induced PCD, since delayed larger ROS generation induced by non-pathogenic LPS did not led to cell death. Despite H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was shown to induce PCD in cultured cultures of *A. thaliana* (Levine et al., 1996), it is noteworthy that PAMP-induced oxidative stress alone is not necessarily sufficient to elicit cell death (Zipfel et al., 2004). We further showed that pretreatment of the cells with LPS<sub>Pcc</sub> as LPS<sub>P.aeruginosa</sub> could decrease the cell death induced by a co-infection with the bacteria *Pcc* during 24h. This suggests that LPS<sub>Pcc</sub> could induce antagonist responses, a direct PCD and an inhibition of *Pcc*-induced cell death. The fact that the decrease in *Pcc*-induced cell death by LPS<sub>Pcc</sub> is weaker than the one induced by LPS<sub>P.aeruginosa</sub> during the first 24h could reflect the conflicting effects of LPS<sub>Pcc</sub>. These data reinforce the hypothesis that a LPS could induce several signaling pathways in *Arabidopsis* cells perhaps through recognition of structural features within LPS that are not necessarily widely conserved. Effectively, various studies point out that in plant the three parts of the LPS, the lipid A, the core oligosaccharide and the OPS could be active in defense related gene induction (Zeidler et al., 2004; Bedini et al., 2005; Silipo et al., 2005) and HR suppression (Newman et al., 1997;

Bedini et al., 2005; Silipo et al., 2005). But in *Arabidopsis* leaves the defense responses occurred in two phases, the core oligosaccharide inducing an early phase and the lipid A moiety only a later phase (Silipo et al., 2005). Thus, some common responses between pathogenic LPS and non-pathogenic LPS could be due to conserved structures, when specific response could be due to non-conserved part of the LPS.

In animal as well as in plant, modifications in the structure of the lipid A, such as palmitoylation, acylation and phosphorylation could influence biological activity of LPS (Bishop, 2005; Munford and Varley, 2006; Gutschmann et al., 2007), notably in triggering innate immune responses (Silipo et al., 2008). Alterations in lipid A or other structures within LPS were shown to occur during interactions with plants (Kannenberg and Carlson, 2001; Fischer et al., 2003). The isolation of pagP mutants from animal pathogenic Gram-negative bacteria has revealed that palmitoylated lipid A can both protect the bacterium from certain host immune defenses and attenuate the ability of lipid A to activate those same defenses through the TLR4 signal transduction pathway (Bishop, 2005). In *Pcc*, a homologue of pagP have been cloned (Erbs and Newman, 2012), and it thus will be of interest to know if LPS<sub>Pcc</sub> palmitoylation could be responsible for the different responses we observed and if such modification could have a role in virulence.

In conclusion, this study provides evidence on the ability of *Arabidopsis* cells to display specific responses to pathogenic LPS when compared to those from non-pathogenic LPS. Although part of the responses to both types of LPS could overlap, different signaling pathways could be activated, and among the LPS-induced responses the differential kinetic and amplitude in ROS generation seemed to be determinant to induce PCD in *Arabidopsis* cells, allowing putative role of pathogenic LPS in virulence, as previously reported for LPS<sub>Pa</sub> (Evans et al. 2010)

## Acknowledgements

This work was supported by the Agronomic Research for Development Project PRAD N° 07-07 and the “Agence Universitaire de la Francophonie” (AUF).

## References

- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L.R., and Ausubel, F.M. 2003. *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Current Biology* 13:47-52.
- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:601-611.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., and Berkowitz, G.A. 2007. Death Don't Have No Mercy and Neither Does Calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel2 and Innate Immunity. *The Plant Cell Online* 19:1081-1095.
- Ausubel, F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* 6:973-979.
- Becerra, A., Echeverria, C., Varela, D., Sarmiento, D., Armisen, R., Nunez-Villena, F., Montecinos, M., and Simon, F. 2011. Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death. *Cardiovascular Research* 91:677-684.
- Bedini, E., De Castro, C., Erbs, G., Mangoni, L., Dow, J.M., Newman, M.-A., Parrilli, M., and Unverzagt, C. 2005. Structure-Dependent Modulation of a Pathogen Response in Plants by Synthetic O-Antigen Polysaccharides. *Journal of the American Chemical Society* 127:2414-2416.
- Bishop, R.E. 2005. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Molecular Microbiology* 57:900-912.
- Bittel, P., and Robatzek, S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 10:335-341.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I., and Bouteau, F. 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist* 169:209-218.
- Bouteau, F., Dellis, O., and Rona, J.P. 1999. Transient outward K<sup>+</sup> currents across the plasma membrane of laticifer from *Hevea brasiliensis*. *FEBS letters* 458:185-187.

- Brault, M., Amiar, Z., Pennarun, A.-M., Monestiez, M., Zhang, Z., Cornel, D., Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F., and Rona, J.-P. 2004. Plasma Membrane Depolarization Induced by Abscissic Acid in Arabidopsis Suspension Cells Involves Reduction of Proton Pumping in Addition to Anion Channel Activation, Which Are Both Ca<sup>2+</sup> Dependent. *Plant Physiology* 135:231-243.
- Büttner, D., and Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* 34:107-133.
- Coventry, H.S., and Dubery, I.A. 2001. Lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in Nicotiana glauca. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58:149-158.
- Cui, H., Xiang, T., and Zhou, J.-M. 2009. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cellular Microbiology* 11:1453-1461.
- Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., and Shibuya, N. 2006. Bacterial Lipopolysaccharides Induce Defense Responses Associated with Programmed Cell Death in Rice Cells. *Plant and Cell Physiology*.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.R., Andrivon, D., and Val, F. 2006. Lipopolysaccharides of Pectobacterium atrosepticum and Pseudomonas corrugata Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biology* 8:636-645.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-847.
- Dow, M., Newman, M.-A., and von Roepenack, E. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology* 38:241-261.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 4:421-425.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* 13:95-104.
- Erbs, G., Molinaro, A., Dow, J.M., and Newman, M.A. 2010. Lipopolysaccharides and plant innate immunity. *Sub-cellular biochemistry* 53:387-403.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.-A., and Cooper, R.M. 2008. Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens Agrobacterium and Xanthomonas Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry & biology* 15:438-448.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., Briand, J., Madiona, K., Rona, J.P., Barakate, M., Wendehenne, D., Beaulieu, C., and Bouteau, F. 2008. An early Ca<sup>2+</sup> influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in Arabidopsis thaliana cells. *Journal of Experimental Botany* 59:4259-4270.
- Evans, T.J., Ind, A., Komitopoulou, E., and Salmond, G.P.C. 2010. Phage-selected lipopolysaccharide mutants of Pectobacterium atrosepticum exhibit different impacts on virulence. *Journal of Applied Microbiology* 109:505-514.

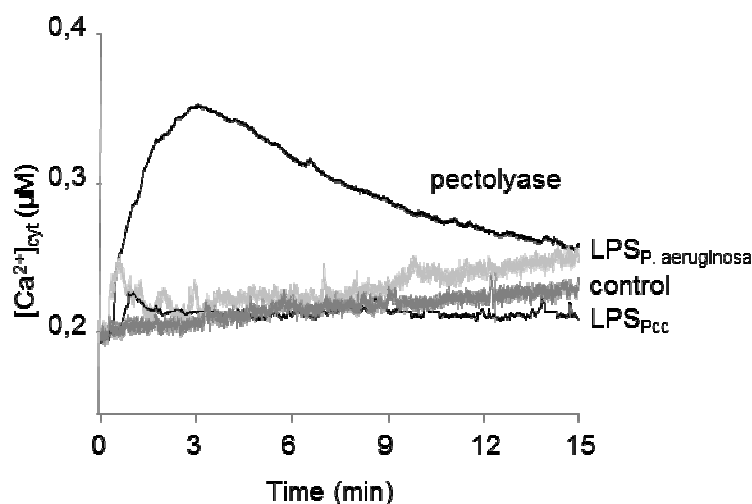
- Fischer, S.E., Miguel, M.J., and Mori, G.B. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *Fems Microbiology Letters* 219:53-62.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Gerber, I., Zeidler, D., Durner, J., and Dubery, I. 2004. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* 218:647-657.
- Gerber, I.B., and Dubery, I.A. 2004. Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry* 65:2957-2966.
- Gerber, I.B., Laukens, K., De Vijlder, T., Witters, E., and Dubery, I.A. 2008. Proteomic profiling of cellular targets of lipopolysaccharide-induced signalling in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784:1750-1762.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. 2006. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60:425-449
- Gutsmann, T., Schromm, A.B., and Brandenburg, K. 2007. The physicochemistry of endotoxins in relation to bioactivity. *International Journal of Medical Microbiology* 297:341-352.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Hoeberichts, F.A., and Woltering, E.J. 2003. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25:47-57.
- Kadono, T., Tran, D., Errakhi, R., Hiramatsu, T., Meimoun, P., Briand, J., Iwaya-Inoue, M., Kawano, T., and Bouteau, F. 2010. Increased Anion Channel Activity Is an Unavoidable Event in Ozone-Induced Programmed Cell Death. *PLoS ONE* 5:e13373.
- Kannenberg, E.L., and Carlson, R.W. 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Molecular Microbiology* 39:379-391.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. 1996. Cold Calcium Signaling in *Arabidopsis* Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *The Plant Cell Online* 8:489-503.
- Kramer, B.C., Yabut, J.A., Cheong, J., Jnobaptiste, R., Robakis, T., Olanow, C.W., and Mytilineou, C. 2002. Lipopolysaccharide prevents cell death caused by glutathione depletion: Possible mechanisms of protection. *Neuroscience* 114:361-372.
- Krause, M., and Durner, J. 2004. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:131-139.

- Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J.C., and Gorvel, J.-P. 2006. Differential inductions of TNF- $\alpha$  and I $\kappa$ B by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular Microbiology* 8:401-413.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* 171:249-269.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6:427-437.
- Livaja, M., Zeidler, D., von Rad, U., and Durner, J. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* 213:161-171.
- Meimoun, P., Vidal, G., Bohrer, A.-S., Lehner, A., Tran, D., Briand, J., Bouteau, F., and Rona, J.-P. 2009. Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 4:830-835.
- Meyer, A., Pühler, A., and Niehaus, K. 2001. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213:214-222.
- Mole, B., Habibi, S., Dangl, J.L., and Grant, S.R. 2010. Gluconate Metabolism Is Required for Virulence of the Soft-Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:1335-1344.
- Munford, R.S., and Varley, A.W. 2006. Shield as signal: Lipopolysaccharides and the evolution of immunity to Gram-negative bacteria. *Plos Pathogens* 2:467-471.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D.G. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135:1113-1128.
- Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A., and Parrilli, M. 2007. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research* 13:69-84.
- Newman, M.A., Daniels, M.J., and Dow, J.M. 1997. The activity of lipid A and core components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:926-928.
- Nolan, Y., Vereker, E., Lynch, A.M., and Lynch, M.A. 2003. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Experimental Neurology* 184:794-804.
- Nürnberg, T., and Lipka, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6:335-345.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198:249-266.

- Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., Graziana, A., Muto, S., Ranjeva, R., and Mazars, C. 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 30:413-421.
- Reboutier, D., Frankart, C., Vedel, R., Brault, M., Duggleby, R.G., Rona, J.P., Barny, M.A., and Bouteau, F. 2005. A CFTR chloride channel activator prevents HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:567-572.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J.-P., Haapalainen, M., Barny, M.-A., and Bouteau, F. 2007. Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 120:3271-3278.
- Reboutier, D., Bianchi, M., Brault, M., Roux, C., Dauphin, A., Rona, J.-P., Legué, V., Lapeyrie, F., and Bouteau, F. 2002. The Indolic Compound Hypaphorine Produced by Ectomycorrhizal Fungus Interferes with Auxin Action and Evokes Early Responses in Nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:932-938.
- Sanabria, N.M., and Dubery, I.A. 2006. Differential display profiling of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344:1001-1007.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., and Nagano, T. 2003. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* 278:3170-3175.
- Silipo, A., Sturiale, L., Garozzo, D., Erbs, G., Jensen, T.T., Lanzetta, R., Dow, J.M., Parrilli, M., Newman, M.-A., and Molinaro, A. 2008. The acylation and phosphorylation pattern of lipid A from *Xanthomonas campestris* strongly influence its ability to trigger the innate immune response in *Arabidopsis*. *ChemBioChem* 9:896-904.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.-A., and Parrilli, M. 2005. The Elicitation of Plant Innate Immunity by Lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biological Chemistry* 280:33660-33668.
- Terta, M., Kettani-Halabi, M., Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'Hand, R.A., El-Maarouf-Bouteau, H., Val, F., Ennaji, M.M., and Bouteau, F. 2010. *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:139-143.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. 2009. Network Properties of Robust Immunity in Plants. *Plos Genetics* 5.
- Val, F., Barzic, M.-R., Desender, S., Hamelin, G., and Andrivon, D. (2006). Stockage des pommes de terre: Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien ? Évaluation d'un candidat pour la protection biologique des tubercules de pomme de terre contre les bactérioses. *Phytoma, la défense des végétaux* 596:33-36.
- Van Doorn, W.G. 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany* 62:4749-4761.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., van der Heijdt, W.H.W., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2008. Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1609-1621.

- Westphal, O., and Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure. (Methods in Carbohydrate Chemistry), pp. 83–91.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15811-15816.
- Zhang, J., and Zhou, J.-M. 2010. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant* 3:783-793.
- Zhou, J.-M., and Chai, J. 2008. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion in Microbiology* 11:179-185.
- Zipfel, C., and Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* 8:353-360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749-760.
- .

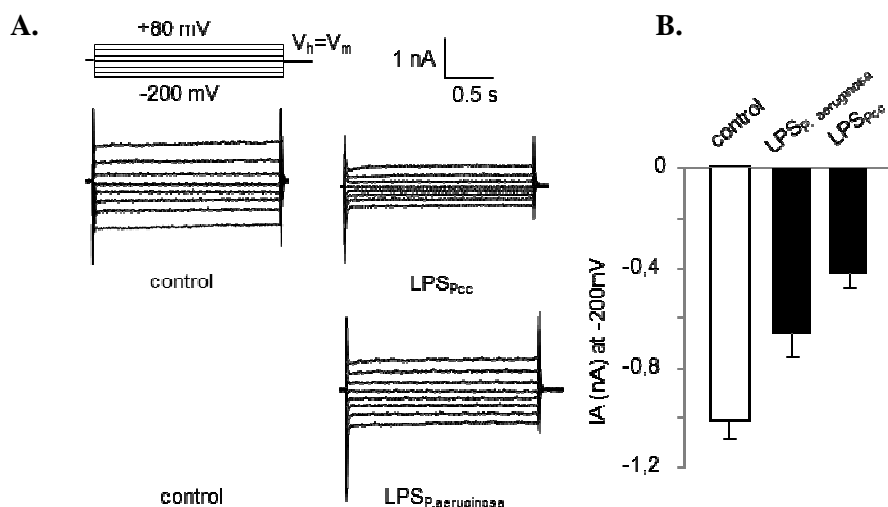




**Supplemental figure 1.** Recordings of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  of *Arabidopsis* cells expressing the apoaquorin gene upon addition of  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>P. aeruginosa</sub>.

Pectolyase at  $26 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was used as a positive control. At least 3 independent experiments were carried out and gave similar results.

For determination of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  variations upon LPS treatment, we used *A. thaliana* cell suspensions expressing the apoaquorin gene in the cytosol (Bouizgarne et al., 2006) and maintained in Gamborg medium. For calcium measurement, aequorin was reconstituted by overnight incubation of cell suspensions with  $2.5 \mu\text{M}$  native coelenterazine (Sigma). A total of  $500 \mu\text{L}$  of cell suspension was transferred carefully into a luminometer glass tube, and the luminescence counts were recorded continuously, at 0.2 s intervals, with a FB12-Berthold luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Treatments were performed by addition of LPS directly into the luminometer tubes. At the end of each experiment, the residual aequorin was discharged by the addition of 100% (v/v) methanol and 1 M  $CaCl_2$  (final concentration). The resulting luminescence was used to estimate the total amount of aequorin in each experiment. Calibration of calcium measurements was performed by using the equation:  $pCa = 0.332588(-\log k) + 5.5593$ , where  $k$  is a rate constant equal to luminescence counts per second divided by total remaining counts.



**Supplemental figure 2.** **A.** Whole cell ion currents measured under control conditions and 9 min after adding  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  LPS<sub>Pcc</sub> or LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. The protocol was as illustrated, holding potential ( $V_h$ ) was  $V_m$ . **B.** Mean values of the ion currents, recorded at -200 mV and 0.1 s, after elicitation by LPS. Data correspond to mean values  $\pm$  SD of at least 5 independent experiments.

The cultured cells were impaled in the culture medium as previously described (Reboutier et al., 2007; Meimoun et al., 2009). Cells were immobilized with a microfunnel (approximately 30–80  $\mu\text{m}$  o.d.) and controlled by a pneumatic micromanipulator. Impalements were carried out with a piezoelectric micromanipulator (PCS-5000, Burleigh, NY) on cultured cells in a chamber (500 mL) made of perpeX. Microelectrodes were performed with borosilicate capillary glass (Clark GC 150F, Clark Electromedical, Pangbourne Reading, UK). Their tips were 0.5  $\mu\text{m}$  diameter, filled with 600 mM KCl, and had electrical resistances between 30 and 80 M $\Omega$  in the culture medium. Individual cells were voltage-clamped using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) which allows the switch clamp technique. In this technique, both current passing and voltage recording use the same microelectrode. Interactions between the two tasks are prevented by time sharing techniques. Voltage and current were digitized with a personal computer fitted with a Digidata 1320A acquisition board (Axon Instruments). The electrometer was driven by pClamp software (pCLAMP8, Axon Instruments). The currents were obtained by polarizing pulses from -200 to +80 mV (40 mV, 2 s steps). We systematically checked that cells were correctly clamped by comparing the protocol voltage values with those really imposed. Current-voltage relationships were obtained from currents, normalized at the holding potential and measured at 2000 ms for steady-state currents. Experiments were performed at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  on 4-day-old cultures.

#### Article n°4

---

*Les lipopolysaccharides, biostimulants pour la protection de la pomme de terre contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum**

**Mohamed Kettani-Halabi**, Mohamed Amdan, Meriem Terta, Daniel Tran, Amine Yekkour, Florence Val, Moulay Mustapha Ennaji, François Bouteau.

**Published in Moroccan Journal of Plant Protection**

## Les lipopolysaccharides, biostimulants pour la protection de la pomme de terre contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

**Mohamed Kettani-Halabi**<sup>1,2</sup>, Mohamed Amdan<sup>2</sup>, Meriem Terta<sup>2</sup>, Daniel Tran<sup>1</sup>, Amine Yekkour<sup>3</sup>, Florence Val<sup>4</sup>, Moulay Mustapha Ennaji<sup>2</sup>, François Bouteau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, LEM, IBP 91405 Orsay, France

<sup>2</sup>LVHM - Université Hassan II Mohammedia, FSTM – Maroc

<sup>3</sup>LBSM – Ecole Nationale Supérieure de Kouba, Alger – Algérie

<sup>4</sup>UMR BIO3P– INRA Agrocampus Ouest – Université Rennes 1, France

### RESUME

Les bactéries macérogènes appartenant à l'espèce *Pectobacterium carotovorum* sont responsables de pertes conséquentes pour l'ensemble de la filière pomme de terre. Jusqu'à maintenant, aucun traitement biologique ne permet de lutter efficacement contre ces bactéries. Dans cette étude, nous avons testé les effets de protection des lipopolysaccharides (LPS), composés de la paroi des bactéries Gram négatif, connus pour déclencher des réponses de défense chez les plantes. Des LPS extraits d'une bactérie non phytopathogène, *Pseudomonas aeruginosa* (LPS *P.aeruginosa*) et d'une bactérie pathogène, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (LPS *Pcc*), ont été testés afin de comparer leurs efficacités respectives sur deux modèles végétaux : la pomme de terre (cv désirée) et les suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*, contre *Pcc*. Nos résultats montrent un effet de protection partielle de ces LPS, dépendant à la fois du temps de contact et de l'origine des LPS.

**Mots clé :** *Solanum tuberosum*, LPS, *Arabidopsis thaliana*, réactions de défense.

L'auteur correspondant: Moulay Mustapha Ennaji.

E-mail: m.ennaji@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Actuellement, un des challenges majeurs pour les scientifiques est de trouver des solutions permettant d'augmenter la production alimentaire mondiale. En effet, pour nourrir la population estimée à 9 milliard en 2050, cette production doit augmenter de 70%. En ce qui concerne les productions végétales, les recherches doivent se focaliser sur la gestion des stress abiotiques et biotiques auxquels sont soumises les plantes dans leur environnement. En effet, l'infection des cultures par les agents phytopathogènes réduit de façon conséquente la qualité et le rendement de l'agriculture (Brimner and Boland, 2003). D'après les statistiques de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO-1999), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 15% des dommages étant d'origine bactérienne.

Au Maroc, la culture de la pomme de terre occupe annuellement une superficie d'environ 60500 hectares et permet de produire près de 1,6 millions de tonnes de tubercules (FAO–2012). Cependant, cette culture est menacée, chaque année, par les attaques de différents microorganismes phytopathogènes comme par exemple les *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*, anciennement *Erwinia carotovora carotovora*). Ces entérobactéries provoquent des dégâts importants (pourriture molle) au champ, en serre et en conservation (Pérombelon, 2002). L'utilisation de méthodes de lutte basées sur des molécules bioactives induisant la résistance naturelle de l'hôte pourrait s'avérer efficace contre ces *Pectobacterium* sp. (Val et al., 2006). Ainsi, la société Plant Health Care a mis au point une molécule: EMPLOY® qui active les défenses naturelles des plantes. Son principe actif, est une protéine de type harpin (HrpN), sécrétée par la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*, responsable de la maladie du feu bactérien. Différentes études menées sur cette biomolécule en particulier chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (El-Maarouf et al., 2001; Reboutier et al., 2007) montrent qu'elle active différentes voies de signalisation conduisant aux réponses de défense de la plante. Ces réponses sont impliquées dans le biocontrôle contre diverses attaques bactériennes, virales ou fongiques (Fan et al., 2011).

Les Lipopolysaccharides (LPS), composés ubiquistes de la paroi des bactéries Gram négatif sont également connus pour déclencher des réponses de défenses après leur reconnaissance par les plantes (Zeidler et al., 2004; Silipo et al., 2010), notamment chez les solanacées (Desender et al., 2006). Ils induisent la stimulation du métabolisme oxydatif, l'expression de

certaines gènes de défense et le renforcement de la paroi cellulaire par dépôt de callose et de composés phénoliques (Erbs and Newman, 2012). Ces LPS sensibilisent aussi les plantes leur permettant de répondre plus rapidement et de façon plus importante lors d'une agression par un phytopathogène (Erbs and Newman, 2012). Ainsi, les LPS de la bactérie phytopathogène *Pcc* se sont révélés efficaces pour protéger des tubercules de pomme de terre contre le *Pcc* lui-même (Val et al., 2006). Toutefois, les LPS semblent nécessaires pour la survie du pathogène (Molinaro et al., 2009) et participeraient même à la virulence de ces pathogènes (Evans et al., 2010). Dans notre étude, nous avons testé les effets de protection de deux types de LPS : l'un extrait de la bactérie phytopathogène *Pcc*, l'autre d'une bactérie non phytopathogène, *Pseudomonas aeruginosa* afin de comparer leurs efficacités respectives.

## MATERIELS ET METHODES

### Matériel bactérien

Deux souches de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolées de pomme de terre ont été utilisées dans cette étude : la souche . P116C3 conservée au sein du Laboratoire de Virologie et Hygiène & Microbiologie (LVHM) à Mohammedia (Maroc), et la souche CFBP5980 conservée au sein de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes à Angers (France). Pour les inoculations, les suspensions bactériennes ont été utilisées à des concentrations de  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

### Matériel végétal

Une suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia) et des tubercules de pomme de terre (cv désirée) ont été utilisés pour l'étude.

Les cellules d'*A. thaliana* ont été cultivées à  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sous agitation (120 rpm) et sous une lumière blanche 40  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , dans un ballon de 300 mL de milieu Gamborg (pH = 5.8). Elles ont été repiquées tous les 7 jours dans un milieu frais. Les expériences ont été menées sur des cultures de 4 jours.

### Lipopolysaccharides

Deux types de lipopolysaccharides purifiés à partir de *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (LPS<sub>Pcc</sub>) et *Pseudomonas aeruginosa* (LPS<sub>P.aeruginosa</sub>) ont été utilisés. Les LPS<sub>Pcc</sub>

ont été purifiés comme décrit dans les travaux de Desender et al (2006), les LPS<sub>P. aeruginosa</sub> étant commercialement disponibles (Sigma, France).

### Tests de pathogénie

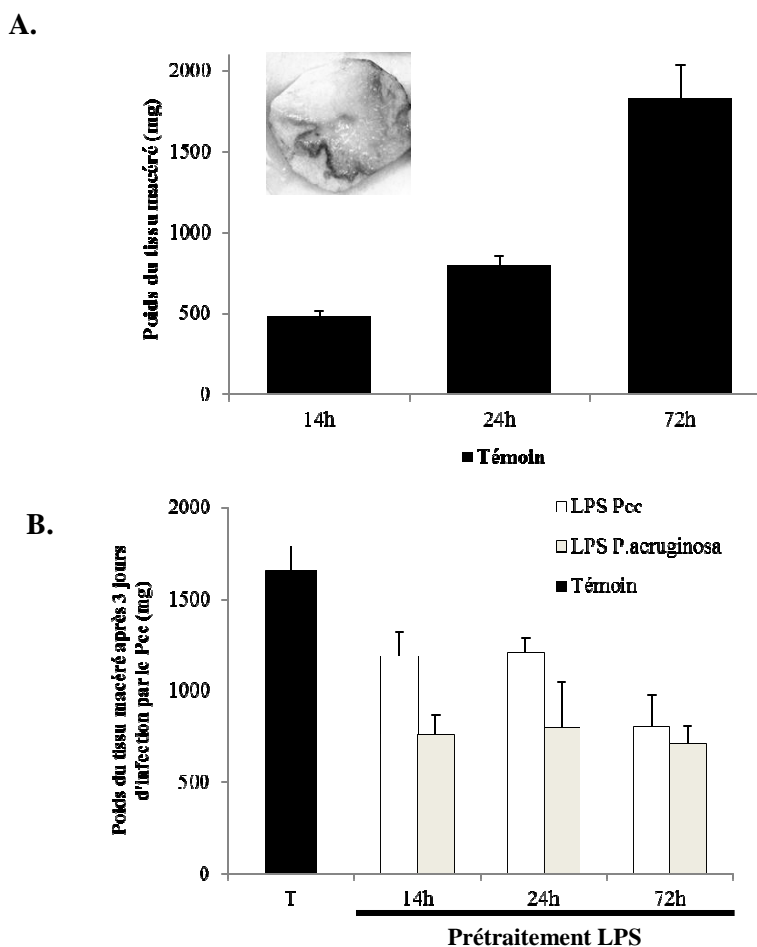
Pour les inoculations, les *Pcc* ont été récupérées, après 24h de culture, dans du LPGA à 27°C. Puis une suspension de  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> a été préparée. Pour les pommes de terre, les tests ont été réalisés sur des demi-tubercules préalablement désinfectés par trempage pendant 5 mn dans de l'éthanol à 50 %. Les demi-tubercules ont été traités pendant 14h, 24h ou 72h par 100 µg.mL<sup>-1</sup> de LPS<sub>Pcc</sub> ou LPS<sub>P.aeruginosa</sub> déposés dans des puits creusés à l'emporte-pièce au centre du tubercule. Ensuite, les bactéries ont été inoculées par dépôt de 50 µL de la suspension à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> après les différents temps de contact. Des demi-tubercules témoins ont été traités avec de l'eau. Le développement de la maladie a été mesuré 3 jours après inoculation par pesée des pourritures. Trois demi-tubercules ont été réalisés par traitement. Chaque expérience a été répétée trois fois. Les données obtenues ont été analysées par ANOVA suivi par un test de Newman-Keuls de comparaison de moyennes ( $P < 0,05$ ).

Pour les cultures cellulaires d'*A. thaliana*, les tests ont été réalisés par l'infection de 1 mL de culture par 100 µL de la suspension bactérienne à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> après 14h, 24h ou 72h de prétraitement par 100 µg.mL<sup>-1</sup> de LPS<sub>Pcc</sub> ou LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. La mort cellulaire a été suivie par coloration vitale au Bleu Evans (Terta et al., 2010).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### A. Sur tubercules de pomme de terre

Lorsque les demi-tubercules de pomme de terre ont été traités avec  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> de *Pcc* (P116C3) des symptômes caractéristiques de pourriture molle causés par une macération des tissus du tubercule ont été observés (Fig1A, encart), le poids de tissu macéré augmentant de 14 à 72h (Fig. 1A). Par contre, lorsque les demi-tubercules de pomme de terre ont été traités au préalable avec 100 µg.mL<sup>-1</sup> de LPS<sub>Pcc</sub> ou LPS<sub>P.aeruginosa</sub> pendant (14h, 24h ou 72h) puis infectés par *Pcc*, une protection significative a été observée même après 72h d'infection par *Pcc* (Fig. 1B).



**Figure 1 :** **A.** Augmentation du poids de tissu macéré de tubercule de pomme de terre induite par  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* au cours du temps. Encart : aspect de la macération du tissu végétatif sur un demi-tubercule 24h après l'inoculation de *Pcc*. **B.** Effet des prétraitements par les LPS<sub>Pcc</sub> et LPS<sub>P.aeruginosa</sub> sur le poids de tissu macéré par le *Pcc*. Les bars portant la même lettre ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ ).

Si la protection observée lors de prétraitements de 14 et 24h en présence de LPS est plus importante pour les prétraitements par LPS<sub>P.aeruginosa</sub>, cette différence entre les deux LPS n'est plus significative après 72h (Fig. 1B). L'effet protecteur semble dépendant du temps de prétraitement pour les LPS<sub>Pcc</sub> alors qu'il ne l'est pas pour les LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Si les LPS de bactéries pathogènes et en particulier de *Pcc* permettent de protéger partiellement les tubercules de pomme de terre contre les *Pectobacterium* sp comme cela a déjà pu être montré sur différents cultivars (Desender et al., 2006; Val et al., 2006), il semble que les LPS de bactéries non phytopathogènes soient plus efficaces au moins sur des temps plus courts. Ceci pourrait être dû au fait que les LPS des bactéries pathogènes pourraient participer à la



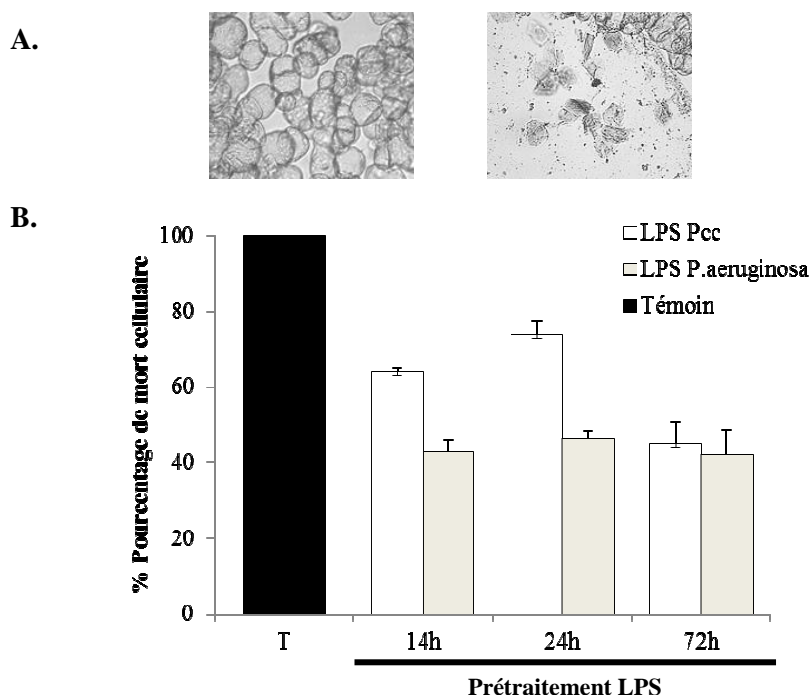
virulence (Evans et al., 2010), ce dernier rôle antagoniste limitant les effets protecteurs précoces.

### **B. Sur cellules d'*A. thaliana***

Nous avons récemment pu montrer que les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* pouvaient être un bon modèle pour étudier les processus impliqués dans l'agressivité de *Pcc* (Terta et al., 2010), et qu'elles pouvaient également permettre de discriminer des événements cellulaires impliqués lors de processus de biocontrôle de cette bactérie (Annexe 6). Nous avons donc utilisé des cellules en culture d'*A. thaliana* pour vérifier si les effets observés sur tubercules de pomme de terre se reproduisaient lors d'une infection des cultures cellulaires par *Pcc*.

Lors de ces infections, une destruction des parois des cellules due aux activités pectinolytiques de *Pcc* (Terta et al., 2010) est aisément observable au microscope au bout de quelques heures (Fig. 2A). Cette dégradation des parois pourrait être corrélée aux symptômes de pourriture molle observés sur tubercule de pomme de terre (Fig 1A).

Le taux de cellules mortes suite à un traitement de 24h par  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> de *Pcc* (CFBP5980) est de 100% (Fig 2B). Une réduction significative de la mort cellulaire causées par *Pcc* est observée (Fig 2B) lorsque ces cellules sont prétraitées avec 100 µg.mL<sup>-1</sup> de LPS<sub>Pcc</sub> ou LPS<sub>P.aeruginosa</sub> avant inoculation. Comme préalablement observé sur tubercule (Fig 1B), la protection observée lors de prétraitements de 14 et 24h en présence des LPS est plus importante pour les prétraitements par LPS<sub>P.aeruginosa</sub>, cette différence n'étant plus significative après 72h (Fig. 2B).



**Figure 2 :** **A.** Photographie de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension avant infection (à gauche) et 12h après l'infection par *Pcc* (à droite). **B.** Effet des LPS et de la durée de prétraitement sur la mort cellulaire des cellules d'*A. thaliana* induite par *Pcc* après 24h de co-culture. Un taux basal de 15% de cellules mortes a été enregistré sur les cultures sans aucun traitement. Les bars portant la même lettre ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ ).

Le pourcentage de mort cellulaire pour un prétraitement de 14h est réduit de 50% chez les cellules traitées par le LPS<sub>*P.aeruginosa*</sub> et de 22% par le LPS<sub>*Pcc*</sub> après 24h d'incubation. Par contre, lorsque les cellules d'*Arabidopsis* sont traitées 72h avec les LPS<sub>*Pcc*</sub> ou LPS<sub>*P.aeruginosa*</sub> puis infectées par la bactérie *Pcc*, la réduction de mort cellulaire est d'environ 50% quel que soit le LPS utilisé.

Dans l'ensemble nos résultats confirment qu'un prétraitement par les LPS des bactéries Gram négatif peuvent protéger au moins partiellement les cellules végétales d'une agression par une bactérie phytopathogène, en déclenchant des réponses d'immunité innée chez la plante (Erbs and Newman, 2012). Nos données suggèrent cependant que suivant l'origine des LPS (de bactéries pathogènes ou de non pathogènes), la durée de mise en place de cette protection peut varier. L'utilisation de cellules en culture d'*A. thaliana* devrait permettre, d'un point de vue fondamental, d'analyser les effets cellulaires des différents LPS et permettre de mieux comprendre les éventuelles différentes voies de signalisation induites par les différents LPS

expliquant les retards de protection observés en utilisant LPS<sub>Pcc</sub>. D'un point de vue pratique, les études réalisées sur *A. thaliana* pourraient permettre d'affiner les durées de traitements et les doses optimales de LPS permettant de stimuler les défenses naturelles de l'hôte. Ces études pourraient être transférées à la pomme de terre dans le but d'augmenter sa résistance aux Pcc.

## Remerciements

Ce travail a été soutenu financièrement par l'Agence Universitaire de Francophonie AUF et le Projet de Recherche et Développement franco-marocain PRAD N° 07-07.

## Références bibliographiques

- Baz, M., Tran, D., Kettani-Halabi, M., Samri, S.E., Jamjari, A., Biligui, B., Meimoun, P., El-Maarouf-Bouteau, H., Garmier, M., Saindrenan, P., Ennaji, M.M., Barakate, M., and Bouteau, F. 2012. Calcium and ROS mediated defense responses in BY2 tobacco cells by non-pathogenic *Streptomyces* sp. *Journal of Applied Microbiology*:no-no.
- Brimner, T.A., and Boland, G.J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100:3-16.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.R., Andrivon, D., and Val, F. 2006. Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biology* 8:636-645.
- El-Maarouf, H., Barny, M.A., Rona, J.P., and Bouteau, F. 2001. Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS letters* 497:82-84.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* 13:95-104.
- Evans, T.J., Ind, A., Komitopoulou, E., and Salmond, G.P.C. 2010. Phage-selected lipopolysaccharide mutants of *Pectobacterium atrosepticum* exhibit different impacts on virulence. *Journal of Applied Microbiology* 109:505-514.
- Fan, J., Qian, G., Yang, X., Gu, C., Kang, Y., Ma, Y., Hu, B., and Liu, F. 2011. Biocontrol of bacterial soft rot of calla lily by elicitor Harpin<sub>Xoo</sub> and <i>N</i>-acyl homoserine lactonase (AttM). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:401-410.
- Molinaro, A., Newman, M.-A., Lanzetta, R., and Parrilli, M. 2009. The Structures of Lipopolysaccharides from Plant-Associated Gram-Negative Bacteria. *European Journal of Organic Chemistry* 2009:5887-5896.

- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J.-P., Haapalainen, M., Barny, M.-A., and Bouteau, F. 2007. Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 120:3271-3278.
- Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J.M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.-A., and Molinaro, A. 2010. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20:406-419.
- Terta, M., Kettani-Halabi, M., Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'Hand, R.A., El-Maarouf-Bouteau, H., Val, F., Ennaji, M.M., and Bouteau, F. 2010. *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:139-143.
- Val, F., Barzic, M.-R., Desender, S., Hamelin, G., and Andrivon, D. (2006). Stockage des pommes de terre: Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien ? Évaluation d'un candidat pour la protection biologique des tubercules de pomme de terre contre les bactérioses., l.d.d.v. *Phytoma*, ed, pp. pp. 33-36.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15811-15816.

# **Chapitre 5**

## Discussion générale

## Chapitre 5. Discussion générale

Un de nos objectifs dans ce travail de thèse était de développer un outil moléculaire d'identification des souches de *Pectobacterium* sp. qui pourrait servir également d'outil d'évaluation de la diversité génétique de ces sous-espèces. Vingt-neuf isolats de *Pectobacterium* responsables de pourriture molle de pomme de terre ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été caractérisés par des tests biochimiques, microbiologiques et moléculaires. Toutes les souches ont été classées comme des *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) en raison de présence d'amplicons à 434pb et à 666pb amplifiés respectivement avec les amorces spécifiques Y1 et Y2 et les amorces F0145 et E2477 de *Pcc*. Pour étudier la possibilité d'utiliser le gène *pmrA* comme outil d'identification, nous avons construit un dendrogramme (figure 2, chapitre 2) à partir des souches de *Pcc* caractérisées. Notre arbre phylogénétique, basé sur le gène *pmrA* a révélé une identité maximale de 95 à 99% à la souche WPP14 (AB447882.1), une souche connue pour son pouvoir pathogène élevé et une grande diversité parmi les sous-espèces testées due à des mutations de type substitution au niveau nucléotidiques. La distance phylogénétique entre toutes les souches est estimée à 0,02 ce qui suggère que tous les *Pcc* circulant au Maroc, ont pour origine les États-Unis. Suite à l'analyse numérique des séquences de *pmrA* par Neighbor-Joining (NJ) et UPGMA, les taxons ont été divisés en deux groupes I et II avec un degré de similarité de similarité d'environ 96%. Toutefois, les deux groupes étaient représentés par six séquences différentes avec plus de 50% des souches appartenant au groupe I. En plus, et afin de vérifier la diversité génétique au sein de nos sous-espèces, l'alignement de séquence par la méthode « maximum composite likelihood » a été utilisé. La comparaison intra-spécifique des séquences *pmrA* a été déterminée par l'algorithme BLAST pour toutes les souches *Pcc*. Une grande diversité génétique a été constatée avec présence de régions nucléotidiques bien conservées. Nous avons proposé de ce fait, d'utiliser ces régions conservées pour la conception d'amorces spécifiques pour l'identification des souches de *Pcc*. Notre phylogénie (figure 4 du chapitre 2) met toutes les souches dans le groupe *Pcc*. Bien que les phylogénies construites sur la base d'un seul gène puissent ne pas refléter les liens taxonomiques, une analyse phylogénétique des séquences de *pmrA* en complément aux analyses des séquences 16S semble être suffisante pour déterminer si l'ensemble de nos souches peuvent être placées

dans des sous-espèces identiques ou divisées en deux sous-espèces différentes. En conclusion, notre analyse de la séquence *pmrA*, pourraient être utilisés pour identifier et surveiller la diversité de la sous-espèce *Pcc*.

Notre second objectif était aussi lié à la diversité des *Pcc*, en essayant d'évaluer sous un angle complémentaire à la diversité génétique, la diversité fonctionnelle au travers de l'amplitude de réponses induites chez les plantes. Les *Pectobacterium carotovorum* sont connus pour déclencher des réponses de défense et une mort cellulaire chez *A. thaliana*. Afin d'évaluer le degré d'agressivité de *P. carotovorum*, nous avons quantifié la mort induite dans une suspension cellulaire d'*A. thaliana* infectée par *P. carotovorum*. Le résultat a montré une augmentation biphasique de la mort cellulaire chez les cellules d'*A. thaliana*. Une augmentation rapide, mais limitée dans le temps, suivie d'une forte augmentation exponentielle conduisant à la mort de toutes les cellules d'*A. thaliana*. Nous avons également montré que la mort cellulaire observée a été tributaire d'événements induits par la co-culture et non pas attribuée à une simple croissance bactérienne dans le milieu de culture. Le *P. carotovorum* se caractérise par sa capacité à produire des niveaux élevés d'enzymes pectinolytiques (PCWDE), en particulier les pectate-lyases, qui sont principalement responsables de la dégradation de la paroi cellulaire conduisant à la mort cellulaire et à la macération des tissus végétaux. Une augmentation des activités de pectate lyases, mesurée par accumulation d'oligogalacturonates, a effectivement été détectée dans le milieu de culture 4 h après l'infection par les souches de *P. carotovorum*. Nous avons constaté de ce fait que, la cinétique exponentielle de la mort cellulaire et de l'activité des pectate-lyases sont corrélées. Ces données indiquent que les PCWDE sont liées aux conditions de la co-culture. Une augmentation de fuite d'électrolyte a été également enregistrée au cours de la co-culture. Une augmentation corrélée avec la production de PCWDE, qui pourrait être expliqué par la lyse des cellules révélées par la coloration au bleu Evans. Ces données démontrent clairement que les *P. carotovorum* reconnaissent les cellules *A. thaliana* comme cellules hôtes. Cette étude, en nous permettant de mesurer facilement et en parallèle la mort cellulaire, les fuites d'ions, et l'activité enzymatique au cours du temps, elle nous a permis également de tester la diversité d'agressivité de différentes souches isolées au Maroc. Les résultats obtenus pour la séquence d'agressivité ont été équivalents à ceux obtenus sur des tranches de pommes de terre. Ainsi, nous avons conclu que les cultures cellulaires *Arabidopsis thaliana* sont un modèle intéressant pour évaluer le degré d'agressivité des souches de *P. carotovorum*.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que lors de l'infection des cellules d'*Arabidopsis* en suspension par certaines souches virulentes de *P. carotovorum*, nous avons observé une augmentation initiale (d'environ 30%) de la mort cellulaire, donc indépendante de la sécrétion des PCWDE plus tardive, les cellules mortes n'affichant de fait aucune dégradation de la paroi cellulaire. Cette mort cellulaire survenant avant la production des pectate-lyases, suggère l'implication de facteurs de virulence indépendante du QS dans la mort cellulaire observée.

Des PAMPs tels que les harpines sont susceptibles d'induire une mort cellulaire notamment chez les cellules en culture d'*Arabidopsis*. Par ailleurs, il avait été démontré que les LPS de *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) pouvaient participer à la virulence de cette bactérie. Nous nous sommes posé la question de savoir si un PAMP tel que les LPS, constituant majeur de la paroi de toutes les bactéries Gram négatif et donc présent constitutivement avant le déclenchement du quorum-sensing (QS), pourraient participer à l'induction de cette première phase de mort cellulaire. Nous avons montré que le LPS purifié de bactéries phytopathogènes *Pa* et *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (*Pcc*) et de bactéries non phytopathogène *P. aeruginosa* et *E. coli* peuvent effectivement induire des événements cellulaires associés à des réponses de défense chez les cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* comme cela a pu être démontré sur d'autres modèles végétaux. Cependant, certaines réponses semblent être spécifiques aux pathogènes ou aux non-pathogènes et d'autres pourrait être partagées entre les deux types bactérien avec une cinétique variable et amplitudes en fonction de l'origine des LPS utilisés. Nous avons ainsi montré chez les cellules d'*Arabidopsis* que les LPS de bactéries pathogènes induisaient effectivement une mort cellulaire qui n'est pas observée avec les LPS de bactéries non phytopathogènes. Cette mort cellulaire s'accompagne d'une plasmolyse des cellules et nécessite un métabolisme actif, affichant les caractéristiques d'une mort cellulaire programmée. Les LPS étant des molécules thermostables, nous avons infecté des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* par les souches virulentes induisant une mort cellulaire précoce indépendante du QS, une fois inactivées par la chaleur. Aucune augmentation de la mort cellulaire n'a été enregistrée dans ces conditions. Ces résultats préliminaires ne supportent pas l'implication des LPS dans cette phase précoce de mort cellulaire induite par ces souches de *Pcc*. Ceci dit il a aussi été montré que la structure des LPS pouvait être modifiée lors de l'interaction, pouvant expliquer l'absence d'effet observée dans nos conditions. Des expériences complémentaires seront donc nécessaires pour comprendre cette première phase de mort cellulaire induite par certains *Pcc* virulentes.



Quoi qu'il en soit, parmi les réponses cellulaires induites en réponses aux divers LPS testés, LPS<sub>Pa</sub>, LPS<sub>Pcc</sub>, LPS<sub>E.coli</sub> ou encore LPS<sub>P.aeruginosa</sub>, nous avons enregistré comme réponse commune une production de ROS. Bien que, les données disponibles sur le burst oxydatif en réponse à l'élicitation par le LPS soient dépendantes des espèces de plantes et de l'origine des LPS, nos données sont en accord avec des études précédentes montrant que diverses préparations de LPS induisent une production de ROS chez différentes plantes. Dans nos expériences, nous avons cependant montré que la production de ROS liée aux LPS de bactéries phytopathogène est plus rapide et moins intense par rapport aux LPS de bactéries non phytopathogène bien qu'apparemment due dans les deux cas à une stimulation de la NADPH-oxidase. Il est notable que la production précoce de ROS par les LPS de bactéries phytopathogènes semblent faire partie de la voie de signalisation conduisant à la PCD alors que la production retardée par les LPS de bactéries non phytopathogènes, bien que plus importante, ne le soit pas. Par ailleurs, l'induction précoce de la transcription de *PAL1* semble être fortement corrélée à la génération de ROS induite par les LPS quel que soit leur origine puisque le maximum de transcription survient de façon sensiblement synchrone avec le pic de ROS. Ceci suggère d'une part, l'implication d'une voie commune mettant en jeu la production de ROS et la transcription de la PAL1 et d'autre part, que la génération précoce de ROS observée en réponse aux LPS pathogènes pourrait participer à au moins deux voies de signalisation conduisant à la régulation de la transcription de gènes et à la mise en place d'une PCD.

D'autres réponses de défense ont été recherchées dans ce travail de thèse telle que les flux d'ions, les variations de pH et la mort cellulaire. L'utilisation de cellules d'*Arabidopsis* exprimant l'aequorine, nous n'a pas permis de détecter les variations du calcium cytosolique en réponse aux LPS. Cette absence de réponse semble être liée aux modèles végétaux eux-mêmes, puis que nous avons pu enregistrer des variations de calcium cytosolique sur des suspensions cellulaires de tabac BY2 induites en particulier par les LPS<sub>E.coli</sub> ou encore LPS<sub>P.aeruginosa</sub> (Annexe 5). Le même type d'observations a pu être fait en réponse à la harpine HrpN d'*Erwinia amylovora*. Concernant les variations du potentiel membranaire des cellules d'*A. thaliana* en réponse aux LPS, là encore, aucune différence n'a pu être observée entre les différents types de LPS. Par contre, nous avons observé une forte alcalinisation du milieu extracellulaire provoquée par les LPS<sub>P.aeruginosa</sub> et LPS<sub>E. coli</sub> par rapport aux variations du pH induites par les LPS<sub>Pcc</sub>.

Différentes études seront nécessaires pour déterminer comment ces réponses cellulaires s'intègrent dans un réseau de signalisation apparemment complexe pour conduire à des réponses variées. Quoiqu'il en soit les réponses différentielles aux LPS<sub>Pcc</sub> et LPS<sub>P.aeruginosa</sub> sont des indications de la capacité des cellules d'*Arabidopsis* à mettre en place des réponses spécifiques face aux LPS. Cette différence pourrait être due à la reconnaissance de caractéristiques structurales des molécules complexes que sont les LPS et qui ne sont pas nécessairement conservées chez les bactéries pathogènes et non pathogènes.

Les LPS, en déclenchant des réponses d'immunité innée chez les plantes, peuvent protéger les plantes d'une agression par une bactérie phytopathogène. Nous avons donc, en première approche, testé l'impact de prétraitements par ces différents LPS pathogènes et non pathogènes de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*, modèle que nous avons validé, et de tubercule de pomme de terre. Nos données montrent que le prétraitement des cellules d'*A. thaliana* par les LPS<sub>Pcc</sub> peuvent réduire le taux de mort cellulaire observé après 24h d'incubation en présence de la bactérie *Pcc* même si cet effet est moins important que celui des LPS<sub>P.aeruginosa</sub>. Ceci suggère que LPS<sub>Pcc</sub> pourrait induire des réponses antagonistes, une PCD et une inhibition directe de la mort cellulaire induite par *Pcc*. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle un LPS pourrait induire plusieurs voies de signalisation dans les cellules d'*Arabidopsis*, peut-être au travers de la reconnaissance de caractéristiques structurales au sein de LPS qui ne sont pas nécessairement conservées. Les résultats obtenus sur tubercules de pomme de terre montrent la même tendance quant au processus de protection, le différentiel entre les effets protecteurs des LPS<sub>Pcc</sub> et LPS<sub>P.aeruginosa</sub> s'atténuant au bout de 72h. Les 2 types de LPS conduisent à une protection significative contre l'infection par *Pcc*. Ce résultat nous a confirmé les résultats obtenus sur les cellules d'*A. thaliana* et il nous a permis de conclure sur l'efficacité des LPS non phytopathogène dans le biocontrôle contre le *Pcc in vitro*. Toutefois, ces résultats mettent en évidence la complexité et la diversité des effets qui peuvent être induits par une molécule complexe telle que les LPS, de nombreuses études seront là encore nécessaire avant de pouvoir envisager de l'utiliser dans des protocoles de biocontrôle.

Parmi les autres pistes de recherche envisagées pour le biocontrôle des *Pcc* figure l'utilisation d'actinobactéries du genre *Streptomyces*. Nous avons participé en collaboration avec le Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes, de l'Université Cadi Ayyad de Marrakech à une étude concernant les effets protecteurs de filtrats de culture de souches de

*Streptomyces* sur des cellules en culture de tabac et de tubercules de pommes de terre contre *Pcc* (Annexe 6). De façon intéressante, on peut noter que la souche la plus efficace dans la protection contre *Pcc* s'est avérée induire elle aussi une PCD dépendante de la génération de ROS chez les cellules en culture. Il semble donc que, comme dans les cas des LPS de bactéries pathogènes, la PCD observées chez une partie des cellules en culture, à priori contre performante pour un processus de biocontrôle, reflète avant tout la capacité de ces cellules à induire des réponses de défense.

# **Conclusions et perspectives**

## Conclusion et Perspectives

L'objectif de cette thèse était de participer à la compréhension de la biodiversité de *Pectobacterium* spp, responsables de la pourriture molle des pommes de terre au Maroc. Nous avons abordé la question de cette diversité sous différentes entrées. Concernant la diversité génétique, un des sujets d'étude du LVMH de Mohammedia, nos travaux ont permis d'enrichir le soucier existant et de confirmer que la majeure partie des bactéries isolées de tubercules contaminés au Maroc était des *Pectobacterium carotovorum*. Le séquençage du gène *pmrA* a permis de montrer une forte similarité de séquences avec la souche américaine WPP14, connue pour être une souche très virulente. De plus, nous avons montré que la diversité génétique observée au sein des sous espèces de *Pcc* pour ce gène *pmrA*, connu pour être impliqué dans la régulation du pouvoir pathogène des *Pectobacterium*, pourrait en faire un marqueur moléculaire complémentaire d'identification de la sous espèce *Pcc* et donc un outil efficace d'évaluation de la diversité génétique intra-spécifique. Il serait intéressant d'étendre cette étude du séquençage de *pmrA* en complément du 16S rDNA sur un échantillonnage plus large pour mieux étayer le rôle du gène *pmrA* dans les études phylogéniques. La suite de ce travail pourra également être une recherche plus approfondie des liens existants entre les mutations observées dans les séquences *pmrA* et la diversité de virulence exprimée par les souches de *Pcc*.

Concernant la diversité d'agressivité, nous avons développé un nouvel « outil » en utilisant des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* comme moyen de détecter les différences d'agressivité des *Pcc*. Ceci a été obtenu par quantification des cinétiques de trois paramètres associés à la pathogénie de ces bactéries à savoir : l'activité des pectate-lyases, déterminant majeur du pouvoir pathogène des *Pcc*, la fuite des électrolytes, considérée comme un marqueur précoce de la mort cellulaire, et la mort cellulaire des cultures elle-même. Les cinétiques observées pour ces trois paramètres nous ont permis de mettre en évidence des séquences d'agressivité pour les souches de *Pcc* choisies, comparables pour chaque événement enregistré, suggérant que cette mort cellulaire était bien due aux événements qui la précèdent. De plus, ces séquences d'agressivité observées sur culture d'*Arabidopsis* se sont avérées être identiques à celle observée pour l'apparition de symptôme de pourriture sur tubercules de pomme de terre avec les mêmes souches de *Pectobacterium carotovorum*. Ce

qui nous a permis de conclure de l'efficacité des cultures d'*Arabidopsis* dans l'évaluation de l'agressivité des souches de *Pcc*. Il serait intéressant d'étendre l'analyse de la diversité d'agressivité des *Pcc* à l'ensemble du soucier disponible à Mohammedia pour affiner cet outil.

De plus, les données concernant la mort des cellules d'*Arabidopsis* en réponse aux différentes souches de *Pcc* nous ont permis aussi de mettre en évidence une augmentation biphasique du taux de mort cellulaire chez les cellules d'*A. thaliana*. La 1<sup>ère</sup> phase d'augmentation de la mort cellulaire, détectée avant les augmentations d'activités des enzymes pectinolytiques et les fuites d'électrolytes, semble dépendre d'évènements indépendants de la phase d'agressivité déclencher par les facteurs dépendant du quorum sensing. En première approche nous nous sommes posé la question de savoir si cette 1<sup>ère</sup> phase de mort cellulaire pouvait être due à des composants de la surface bactérienne tels que les LPS, reconnu comme MAMP du fait de leur conservation chez l'ensemble des bactéries à Gram négatif. Les LPS étant thermostables, pour vérifier cette hypothèse nous avons tuées les bactéries par choc thermique et nous avons testé leur impact sur les cultures d'*A. thaliana*. Ces bactéries tuées se sont avérées incapables d'induire une mort cellulaire chez les cellules d'*Arabidopsis*. Toutefois, au vu des résultats obtenus avec les LPS purifiés de *Pcc* et *Pa*, l'hypothèse de l'impact de ces LPS ne peut être exclue et il faudrait vérifier si l'éventuelle altération de la structure des LPS après choc thermique ne pourrait pas expliquer cette absence d'effet. En effet, la structure des LPS et leur éventuelle modification lors de l'interaction avec la plante semblent importantes pour l'induction d'un certain nombre de réponses chez la plante (Molinaro et al. 2009 ; Erbs et al. 2010).

Un des autres objectifs de cette thèse était justement d'étudier l'éventuelle diversité des effets induits par les LPS extraits de bactéries phytopathogènes responsables de la pourriture molle (*Pcc* et *Pa*) et de bactéries non phytopathogènes (*P. aeruginosa* et *E. coli*). Nous avons analysé un ensemble de marqueurs de réactions de défense précoces (modification de flux d'ions, production de ROS, variation de calcium cytosolique, modification de pH) et tardives (induction des gènes de défense, mort cellulaire programmée). Ces marqueurs ont été couplés à des approches pharmacologiques permettant de moduler spécifiquement les différentes voies impliquées. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence trois types de réponses différentes aux LPS: les réponses identiques, des réponses communes mais présentant des intensités et de cinétiques différentes et des réponses spécifiques. Ces résultats

indiquent que différentes voies de signalisation pourraient être activées chez *Arabidopsis thaliana*. Il en ressort en particulier que la/les voies de signalisation conduisant aux réponses de défense classique telle que l'alcalinisation du milieu et l'induction des gènes de défense PAL1 et PR1 sont différentes de celle(s) conduisant à l'induction d'une mort cellulaire programmée, spécifiquement observées avec les LPS de bactéries phytopathogènes. Dans la mesure où l'ensemble de ces voies intègrent la production de ROS, localiser l'origine de cette production serait une étude intéressante permettant de mieux comprendre l'éventuel rôle des compartiments cellulaires impliqués dans les réponses de défense chez *A. thaliana*. Par ailleurs, d'après la littérature disponible sur l'activité élicitrice des LPS bactériens, la structure moléculaire des différentes parties qui constituent la molécule de LPS semble être particulièrement importante pour leur activité biologique. Il serait donc intéressant d'identifier chez les LPS des bactéries phytopathogènes les fractions moléculaires capables d'induire les mécanismes de défense de celles capables d'induire la mort cellulaire programmée. En effet, en plus de l'induction de la PCD par les LPS de bactéries phytopathogène, nous avons montré qu'un prétraitement par les LPS pourrait réduire efficacement la mort cellulaire des cultures d'*Arabidopsis* et surtout les symptômes de pourritures provoqués par les *Pcc* sur tubercules de pomme de terre. Avoir une meilleure connaissance des structures moléculaires des LPS reconnues par les cellules végétales et l'origine de l'activation des voies de signalisation cellulaires conduisant aux réponses de défense permettrait d'optimiser la mise au point de nouvelles préparation élictrices de réactions de défense, à base de LPS dans l'optique d'applications agronomiques. Dans cette optique, si la première phase de mort cellulaire, observée dans notre étude de diversité d'agressivité est bien liée au LPS, l'utilisation de LPS purifiés à partir du souchier de *Pcc* disponible à Mohammedia pourrait être intéressant dans la mesure où la 1<sup>ère</sup> phase de mort cellulaire n'est pas observée pour toutes les souches de *Pcc*.

Quoi qu'il soit, in préalable à l'utilisation en biocontrôle de LPS ou portion de LPS contre les *Pectobacterium* sp. serait évidemment de valider sur plantes entières les résultats obtenues au laboratoire, que ce soit sur les effets de protection ou sur l'activation des réactions de défense. Une étude approfondie des doses optimales d'application et une maîtrise des durées de traitement seraient les étapes clés des tests évaluant les effets de protection et d'induction des réactions de défense par les LPS chez des plantes entières.

# **Références bibliographiques**



## Références Bibliographiques

- Aghabozorgy, S., and Niakan, M. 2009. Specific maceration and induction of PR-3 gene in potato tuber tissue by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* type III secretion system mutants. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 12:1576-1580.
- Al-Khodori, S., Kalachikov, S., Morozova, I., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. 2009. The PmrA/PmrB Two-Component System of *Legionella pneumophila* Is a Global Regulator Required for Intracellular Replication within Macrophages and Protozoa. *Infection and Immunity* 77:374-386.
- Albert, M., Jehle, A.K., Mueller, K., Eisele, C., Lipschis, M., and Felix, G. 2010. Arabidopsis thaliana Pattern Recognition Receptors for Bacterial Elongation Factor Tu and Flagellin Can Be Combined to Form Functional Chimeric Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 285:19035-19042.
- Albrecht, C., Boutrot, F., Segonzac, C., Schwessinger, B., Gimenez-Ibanez, S., Chinchilla, D., Rathjen, J.P., de Vries, S.C., and Zipfel, C. 2012. Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:303-308.
- Albus, U., Baier, R., Holst, O., Pühler, A., and Niehaus, K. 2001. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytologist* 151:597-606.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., and Berkowitz, G.A. 2007. Death Don't Have No Mercy and Neither Does Calcium: Arabidopsis cyclic nucleotide gated channel2 and Innate Immunity. *The Plant Cell Online* 19:1081-1095.
- Amy O, C. 2009. Decaying signals: will understanding bacterial–plant communications lead to control of soft rot? *Current Opinion in Biotechnology* 20:178-184.
- Anajjar, B., Aitmhand, R., Timinouni, M., and Ennaji, M.M. 2007. Caractérisation par PCR de deux souches d'*Erwinia carotovora* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre dans la région du grand Casablanca au Maroc. *EPPO Bulletin* 37:175-180.
- Arnold, D.L., Pitman, A., and Jackson, R.W. 2003. Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* 4:407-420.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415:977-983.
- Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., and Zeier, J. 2009. Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:954-971.
- Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antúnez-Lamas, M., and Rodríguez-Palenzuela, P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology* 129:413-425.

- Baier, M., Kandlbinder, A., Golldack, D., and Dietz, K.J. 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell Environ* 28:1012-1020.
- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G.V., Hoefte, M., Lemanceau, P., and Cooke, M. 2007. Special issue: New perspectives and approaches in 'plant growth-promoting rhizobacteria' research - Foreword. *European Journal of Plant Pathology* 119:241-242.
- Barka, E.A., Eullaffroy, P., Clement, C., and Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* 22:608-614.
- Barnard, A.M.L., Bowden, S.D., Burr, T., Coulthurst, S.J., Monson, R.E., and Salmond, G.P.C. 2007. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:1165-1183.
- Bartels, S., Besteiro, M.A.G., Lang, D., and Ulm, R. 2010. Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science* 15:322-329.
- Bartling, S., Wegener, C., and Olsen, O. 1995. Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiology-Uk* 141:873-881.
- Baz, M., Lahbabi, D., Samri, S., Val, F., Hamelin, G., Madore, I., Bouarab, K., Beaulieu, C., Ennaji, M., and Barakate, M. 2012. Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:303-311.
- Beaulieu, C., Boccara, M., and Vangijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia-chrysanthemi* mutants on different plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:197-202.
- Bedini, E., De Castro, C., Erbs, G., Mangoni, L., Dow, J.M., Newman, M.-A., Parrilli, M., and Unverzagt, C. 2005. Structure-Dependent Modulation of a Pathogen Response in Plants by Synthetic O-Antigen Polysaccharides. *Journal of the American Chemical Society* 127:2414-2416.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangel, J.L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* 7:391-399.
- Bell, K.S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M.T.G., Hyman, L.J., Holeva, M.C., Thomson, N.R., Bentley, S.D., Churcher, L.J.C., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M.A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G.P.C., Birch, P.R.J., Parkhill, J., and Toth, I.K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11105-11110.
- Bergelson J, Kreitman M, Stahl EA, Tian D. 2001. Evolutionary Dynamics of Plant R-Genes. *Science* 292: 2281-2285.
- Bettina Stäubli, R.W., Susanne Wymann von Dach. 2008. Pommes de terre et changement climatique, Info resources . Focus 1:08.

- Blanchard, A., and Limache, F. 2005. Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN), D.P.d.p.e. environnement, ed (ENSAM, ENSAR & INA P-G), 3:1-18.
- Blatt, M.R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K., and Jones, J.D.G. 1999. K<sup>+</sup> channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant Journal* 19:453-462.
- Blok, V.C., Pylypenko, L., and Phillips, M.S. 2006. Molecular variation in the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, in relation to virulence. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 71:637-638.
- Boller, T. 2005. Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology* 17:116-122.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.
- Boughammoura, A., Franza, T., Dellagi, A., Roux, C., Matzanke-Markstein, B., and Expert, D. 2007. Ferritins, bacterial virulence and plant defence. *Biometals* 20:347-353.
- Bourgeois, C. 1993. Techniques D'analyse Et De Controle Dans Les Industries Agro-Alimentaires - Le Contrôle Microbiologique. 3:1-331.
- Bouteau, F., and Tran, D. 2012. Plant Response to Stress: Microelectrode Voltage-Clamp Studies. In *Plant Electrophysiology*, A.G. Volkov, ed (Springer-Verlag Berlin Heidelberg ), Part 1:69-90
- Boyd, C., and Keen, N.T. 1993. Characterization of the prtA and prtB genes of *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Gene* 133:115-118.
- Boyer, M.H., Chambost, J.P., Magnan, M., and Cattaneo, J. 1984. Carboxymethyl-cellulase from *Erwinia chrysanthemi*. II. Purification and partial characterization of an endo- $\beta$ -1,4-glucanase. *Journal of Biotechnology* 1:241-252.
- Braun, S.G., Meyer, A., Olst, O., Puhler, A., and Niehaus, K. 2005. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:674-681.
- Brodersen, P., Malinovsky, F.G., Hematy, K., Newman, M.A., and Mundy, J. 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* acd11. *Plant Physiology* 138:1037-1045.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nurnberger, T. 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo Journal* 21:6681-6688.
- Büttner, D., and He, S.Y. 2009. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology* 150:1656-1664.
- Büttner, D., and Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* 34:107-133.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M.S. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:43-54.

- Caffall, K.H., and Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344:1879-1900.
- Cessna, S., and Low, P. 2001. Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum*; cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of  $\text{Ca}^{2+}$  from internal stores. *Planta* 214:126-134.
- Chan, Y.-c., Wu, H.-P., and Chuang, D.-y. 2009. Extracellular secretion of Carocin S1 in *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* occurs via the type III secretion system integral to the bacterial flagellum. *Bmc Microbiology* 9:181.
- Charkowski, A. 2006. The soft rot *Erwinia*. *Plant-Associated Bacteria Part 3*, 423-505.
- Chassot, C., and Metraux, J.P. 2005. The cuticle as source of signals for plant defense. *Plant Biosystems* 139:28-31.
- Chatterjee, A., Liu, Y., and Chatterjee, A.K. 1995. Nucleotide sequence of a pectate lyase structural gene, *pel1* of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain 71 and structural relationship of *pel1* with other *pel* genes of *Erwinia* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:92-95.
- Chen, Y.-E., Yuan, S., Du, J.-B., Xu, M.-Y., Zhang, Z.-W., and Lin, H.-H. 2009. Phosphorylation of Photosynthetic Antenna Protein CP29 and Photosystem II Structure Changes in Monocotyledonous Plants under Environmental Stresses. *Biochemistry* 48:9757-9763.
- Chibane, A. 1999. Techniques de Production de la pomme de terre au Maroc. Transfert de technologie en agriculture, PNTTA, Bull. Transfert de technologie: 52:1-4.
- Chinchilla, D., Boller, T., and Robatzek, S. 2007. Flagellin signalling in plant immunity. Current topics in innate immunity, *Advances in experimental medicine and biology*, 598: 358-371.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803-814.
- Christ, B.C., Christ, B., and Schultz, O.E. 1998. Identifying potato diseases in pennsylvania. PENNSTATE, The Pennsylvania State University, Book:1-26.
- Cirou, A., Uroz, S., Chapelle, E., Latour, X., Orange, N., Faure, D., and Dessaux, Y. 2009. Quorum Sensing as a Target for Novel Biocontrol Strategies Directed at *Pectobacterium*. Recent developments in management of plant diseases *Plant Pathology in the 21st Century*, Volume 1, Part 2:121-131.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., and Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7:210-216.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1062-1071.
- Corbett, M., Virtue, S., Bell, K., Birch, P., Burr, T., Hyman, L., Lilley, K., Poock, S., Toth, I., and Salmond, G. 2005. Identification of a new quorum-sensing-control led virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:334-342.

- Corcuff, R., Mercier, J., Tweddell, R., and Arul, J. 2011. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. *Fungal Biology* 115:220-227.
- Costa, A.B., Eloy, M., Cruz, L., Janse, J.D., and Oliveira, H. 2006. Studies on pectolytic *Erwinia* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E-carotovora* subsp *Atroseptica*. *Journal of Plant Pathology* 88:161-169.
- Coventry, H.S., and Dubery, I.A. 2001. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58:149-158.
- Cuppels, D., and Kelman, A. 1974. Evaluation of Selective Media for Isolation of Soft-Rot Bacteria from Soil and Plant Tissue. *Phytopathology* 64:468-475.
- Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60:999-1013.
- Czerwicka, M., Marszewska, K., Bychowska, A., Dziadziuszko, H., Brzozowski, K., Lojkowska, E., Stepnowski, P., and Kaczynski, Z. 2011. Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039. *Carbohydrate Research* 346:2978-2981.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., and Bourque, S. 2009. Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogin, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* 418:191-200.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1437-1443.
- De Boer, S.H. 1994. Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic *Erwinias*. *Advances in Potato Pest Biology and Management*, APS Press:136-148.
- de Haan, E.G., Dekker-Nooren, T., van den Bovenkamp, G.W., Speksnijder, A., van der Zouwen, P.S., and van der Wolf, J.M. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology* 122:561-569.
- de las Mercedes Pescaretti, M., Lopez, F.E., Morero, R.D., and Delgado, M.A. 2011. The PmrA/PmrB regulatory system controls the expression of the *wzz(fepE)* gene involved in the O-antigen synthesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology-Sgm* 157:2515-2521.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., and Cervone, F. 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39:313-335.
- De Pinto, M.C., Locato, V., and De Gara, L. 2012. Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell and Environment* 35:234-244.

- de Souza, J.T., Mazzola, M., and Raaijmakers, J.M. 2003. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 5:1328-1340.
- Deboer, S.H., and Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85:854-858.
- Delgado, Y.P., Castro, I.G., and Arvelo, F. 2007. Programmed cell death in plants: It is similar to "apoptosis" in animals? *Interciencia* 32:812-819.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., and Expert, D. 2009. Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology* 150:1687-1696.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., and Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13454-13459.
- Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., and Shibuya, N. 2006. Bacterial Lipopolysaccharides Induce Defense Responses Associated with Programmed Cell Death in Rice Cells. *Plant and Cell Physiology*, 11:1530-1540.
- Desender, S., Andrivon, D., and Val, F. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology* 9:21-30.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.R., Andrivon, D., and Val, F. 2006. Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biology* 8:636-645.
- DeYoung, B.J., and Innes, R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* 7:1243-1249.
- Diallo, S. 2007. Etude du signal de quorum sensing de la bactérie psychrotrophe *Pectobacterium atrosepticum*. Application de ces connaissances à la protection de la pomme de terre., e-book:109.
- Dickey, R.S., H.Z., C., and K.U., J. 1984. *Erwinia chrysanthemi*: Serological relationships among strain from several hosts. *Phytopathology*, 11-1388-1394.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-847.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539-548.
- Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501-538.
- During, K., Porsch, P., Fladung, M., and Lorz, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant Journal* 3:587-598.
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10328-10333.

- Durrant, W.E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Dye, D.W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*.II. The "*Carotovora*" group. , *N.Z.J.o.A. Research*, 12:81-97.
- El-Maarouf, H., Barny, M.A., Rona, J.P., and Bouteau, F. 2001. Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS letters* 497:82-84.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 4:421-425.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* 13:95-104.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.-A., and Cooper, R.M. 2008. Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry & biology* 15:438-448.
- Eriksson, A.R.B., Andersson, R.A., Pirhonen, M., and Palva, E.T. 1998. Two-Component Regulators Involved in the Global Control of Virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:743-752.
- Ernst, R.K., Guina, T., and Miller, S.I. 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes and Infection* 3:1327-1334.
- Errakhi, R., Meimoun, P., Lehner, A., Vidal, G., Briand, J., Corbineau, F., Rona, J.P., and Bouteau, F. 2008a. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J Exp Bot* 59:3121-3129.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., Briand, J., Madiona, K., Rona, J.P., Barakate, M., Wendehenne, D., Beaulieu, C., and Bouteau, F. 2008b. An early  $\text{Ca}^{2+}$  influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Experimental Botany* 59:4259-4270.
- Fan, J., Qian, G., Yang, X., Gu, C., Kang, Y., Ma, Y., Hu, B., and Liu, F. 2011. Biocontrol of bacterial soft rot of calla lily by elicitor HarpinXoo and N-acyl homoserine lactonase (AttM). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:401-410.
- FAOSTAT. 2012. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, <http://faostat.fao.org>.
- Faulkner, C., and Maule, A. 2011. Opportunities and successes in the search for plasmodesmal proteins. *Protoplasma* 248:27-38.
- Favey, S., Bourson, C., Bertheau, Y., Kotoujansky, A., and Boccara, M. 1992. Purification of the acidic pectate lyase and nucleotide sequence of the corresponding gene (*pelA*) of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Journal of general microbiology* 138:499-508.
- Felix, G., and Boller, T. 2003. Molecular sensing of bacteria in plants - The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 278:6201-6208.

- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* 4:307-316.
- Felle, H.H. 2001. pH: Signal and Messenger in Plant Cells. *Plant Biology* 3:577-591.
- Ferguson, A.D., and Deisenhofer, J. 2002. TonB-dependent receptors - structural perspectives. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1565:318-332.
- Ferrandez, Y., and Condemine, G. 2008. Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 69:1349-1357.
- Fessehaie, A., De Boer, S.H., and Levesque, C.A. 2003. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* 93:262-269.
- Feussner, I., and Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53:275-297.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Koiv, V., Karlsson, M.B., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. 2000. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:447-455.
- Flor, H.H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Franza, T., Mahé, B., and Expert, D. 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology* 55:261-275.
- Franza, T., Michaud-Soret, I., Piquerel, P., and Expert, D. 2002. Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1181-1191.
- FukasawaAkada, T., Kung, S.D., and Watson, J.C. 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* 30:711-722.
- Fukuoka, S., Kamishima, H., Nagawa, Y., Nakanishi, H., Ishikawa, K., Niwa, Y., Tamiya, E., and Karube, I. 1992. Structural characterization of lipid A component of *Erwinia carotovora* lipopolysaccharide. *Arch. Microbiol.* 157:311-318.
- Gadjev, I., Stone, J.M., and Gechev, T.S. 2008. Programmed Cell Death in Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol.* 270:87-144.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Mol Plant Microbe In* 19:711-724.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:381-391.



- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L' Actualité chimique* 12:91-96.
- Gauthier, A., Lamotte, O., Reboutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2007. Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* 2:86-95.
- Gebhardt, C., and Valkonen, J.P.T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* 39:79-102.
- Gerber, I., Zeidler, D., Durner, J., and Dubery, I. 2004. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* 218:647-657.
- Gerber, I.B., and Dubery, I.A. 2004. Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry* 65:2957-2966.
- Gerber, I.B., Laukens, K., Witters, E., and Dubery, I.A. 2006. Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:369-379.
- Gerber, I.B., Laukens, K., De Vijlder, T., Witters, E., and Dubery, I.A. 2008. Proteomic profiling of cellular targets of lipopolysaccharide-induced signalling in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784:1750-1762.
- Ghosh, P. 2004. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:771-795.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48:909-930.
- Glasner, J.D., Liss, P., Plunkett, G., Darling, A., Prasad, T., Rusch, M., Byrnes, A., Gilson, M., Biehl, B., Blattner, F.R., and Perna, N.T. 2003. ASAP, a systematic annotation package for community analysis of genomes. *Nucleic Acids Research* 31:147-151.
- Glyan'ko, A.K., and Ischenko, A.A. 2010. Structural and Functional Characteristics of Plant NADPH Oxidase: A Review. *Appl Biochem Microplus*, 46:463-471.
- Goehre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.* 46:189-215.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5:1003-1011.
- González, J.E., and Keshavan, N.D. 2006. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:859-875.
- Graham, T.L., Sequeira, L., and Huang, T.S. 1977. Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* 34:424-432.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481-494.

- Greenberg, J.T., and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6:201-211.
- Grenier, A.-M., Duport, G., Pagès, S., Condemine, G., and Rahbé, Y. 2006. The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1956-1965.
- Gross, A., Kapp, D., Nielsen, T., and Niehaus, K. 2005. Endocytosis of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* lipopolysaccharides in non-host plant cells of *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* 165:215-226.
- Guisseppi, A., Aymeric, J.L., Cami, B., Barras, F., and Creuzet, N. 1991. Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene* 106:109-114.
- Guo, F.-Q., and Crawford, N.M. 2005. Arabidopsis Nitric Oxide Synthase1 Is Targeted to Mitochondria and Protects against Oxidative Damage and Dark-Induced Senescence. *The Plant Cell Online* 17:3436-3450.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100-103.
- Gupta, S., Ahmad, N., Husain, M.M., and Srivastava, R.C. 2000. Involvement of nitric oxide in nickel-induced hyperglycemia in rats. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 4:129-138.
- Haapalainen, M., Dauphin, A., Li, C.M., Bailly, G., Tran, D., Briand, J., Bouteau, F., and Taira, S. 2012. HrpZ harpins from different *Pseudomonas syringae* pathovars differ in molecular interactions and in induction of anion channel responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 51:168-174.
- Hammerschmidt, R. 2009. Systemic Acquired Resistance. *Euphytica*, 2:237-243.
- Hashimoto, K., and Kudla, J. 2011. Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93:2054-2059.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:384-397.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M.B., Eriksson, A., Mae, A., Koiv, V., and Palva, E.T. 1995. Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:207-217.
- Heil, M. 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science* 14:356-363.
- Hélia, V. 2008. *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie, C. Agricultures, 4:349-354.

- Helias, V. 1999. Mise au point d'outils de caractérisation et de détection d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre. Application à l'étude de la transmission de la bactérie, via la plante, du tubercule mère vers les tubercules fils en cours de culture., Thèse de Doctorat, 5:02-1999.
- Helias, V., Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J.P., and Jouan, B. 1998. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European journal of plant pathology / European Foundation for Plant Pathology* 104:685-699.
- Hinton, J.C.D., Gill, D.R., Lalo, D., Plastow, G.S., and Salmond, G.P.C. 1990. Sequence of the *peh* gene of *Erwinia carotovora*: homology between *Erwinia* and plant enzymes. *Molecular Microbiology* 4:1029-1036.
- Holeva, M.C., Bell, K.S., Hyman, L.J., Avrova, A.O., Whisson, S.C., Birch, P.R.J., and Toth, I.K. 2004. Use of a Pooled Transposon Mutation Grid to Demonstrate Roles in Disease Development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* Putative Type III Secreted Effector (DspE/A) and Helper (HrpN) Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:943-950.
- Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Molecular Membrane Biology* 22:29-39.
- Howard, R.J., Garland, J.A., and Seaman, W.L. 1994. Diseases and pests of vegetable crops in Canada. An illustrated compendium. The Canadian Phytopathological Society and Entomological Society of Canada, Ottawa.e-book, 1994:1-554.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H., and Robertbaudouy, J. 1992. Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* 174:7807-7818.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Shevchik, V.E., and Nasser, W. 2002. PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases. *Journal of Bacteriology* 184:2664-2673.
- Hyttiäinen, H., Montesano, M., and Palva, E.T. 2001. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:931-938.
- Hyttiäinen, H., Sjöblom, S., Palomaki, T., Tuikkala, A., and Palva, E.T. 2003. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Molecular Microbiology* 50:795-807.
- Hyttiäinen, H. 2005. Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, thèse de doctorat, 2005:24-05.
- INRA Maroc 2007. La protection des plantes des stratégies de lutte intégrées. Les maladies bactériennes de La pomme de terre, INRA, 2007:1-47.
- Iriti, M., and Faoro, F. 2007. Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia* 164:57-64.

- Ito, K., Kobayashi, R., Nikaido, N., and Izaki, K. 1988. DNA structure of pectate lyase I gene cloned from *Erwinia carotovora*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52:479-487.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub>(-) from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *P Natl Acad Sci USA* 94:4800-4805.
- Jiang, M., and Zhang, J. 2003. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Environ* 26:929-939.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., and Hirt, H. 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5:415-424.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kamysz, W., Krollicka, A., Bogucka, K., Ossowski, T., Lukasiak, J., and Lojkowska, E. 2005. Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *Journal of Phytopathology* 153:313-317.
- Kang, H.W., Kwon, S.W., and Go, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52:127-133.
- Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M.R., Fluhr, R., and Fromm, H. 2006. Rapid Transcriptome Changes Induced by Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Transients Reveal ABRE-Related Sequences as Ca<sup>2+</sup>-Responsive cis Elements in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 18:2733-2748.
- Kato, A., Latifi, T., and Groisman, E.A. 2003. Closing the loop: The PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4706-4711.
- Kim, M.H., Cho, M.S., Kim, B.K., Choi, H.J., Hahn, J.H., Kim, C., Kang, M.J., Kim, S.H., and Park, D.S. 2012. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Pectobacterium wasabiae* Using YD Repeat Protein Gene-Based Primers. *Plant Disease* 96:253-257.
- Klaus, H. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:172-177.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S.Q., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., and Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8849- 8855.
- Kligler, I.J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *American Journal of Public Health* 7:1042-1044.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. 1996. Cold Calcium Signaling in Arabidopsis Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *The Plant Cell Online* 8:489-503.
- Koiv, V., Andresen, L., and Mae, A. 2010. AepA of *Pectobacterium* is not involved in the regulation of extracellular plant cell wall degrading enzymes production. *Molecular Genetics and Genomics* 283:541-549.

- Krejzar, V., Mertelík, J., Pánková, I., Kloudová, K., and Kúdela, V. 2008. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp., P.P. Sci., 3:85-90.
- Kröner, A., Hamelin, G., Andrivon, D., and Val, F. 2011. Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: integrating PAMP-triggered response and pathogen growth. PLoS ONE 6:e23331.
- Laatu, M., and Condemine, G. 2003. Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*. Journal of Bacteriology 185:1642-1649.
- Lamb, C., and Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:251-275.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2006. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Free Radical Biology and Medicine 40:1369-1376.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2004. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. Plant Physiology 135:516-529.
- Lanham, P.G., McIlravey, K.I., and Perombelon, M.C.M. 1991. Production of cell wall dissolving enzymes by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in vitro at 27°C and 30°C. Journal of Applied Microbiology 70:20-24.
- Latour, X., Faure, D., Diallo, S., Cirou, A., Smadja, B., Dessaux, Y., and Orange, N. 2008. Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). Cahiers Agricultures, 4:355-360.
- Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., and Bertheau, Y. 1993. Characterization and overexpression of the *pem* gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. Gene 131:17-25.
- Lautier, T. 2007. Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*. I.N.d.S.A.d. Lyon, ebook 2007:1-200.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. The Plant Journal 15:773-781.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. New Phytologist 171:249-269.
- Lehtimäki, S., Rantakari, A., Routtu, J., Tuikkala, A., Li, J., Virtaharju, O., Palva, E.T., Romantschuk, M., and Saarilahti, H.T. 2003. Characterization of the *hrp* pathogenicity cluster of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: high basal level expression in a mutant is associated with reduced virulence. Molecular Genetics and Genomics 270:263-272.
- Lei, S.P., Lin, H.C., Wang, S.S., and Wilcox, G. 1988. Characterization of the *Erwinia carotovora* *pelA* gene and its product pectate lyase A. Gene 62:159-164.
- Lei, S.P., Lin, H.C., Wang, S.S., Callaway, J., and Wilcox, G. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora* *pelB* gene and its product pectate lyase. Journal of Bacteriology 169:4379-4383.

- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., and Delledonne, M. 2009. NO signals in the haze Nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12:451-458.
- Lelliott, R.A., and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications in Oxford, 2: 1-216.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell* 79:583-593.
- Lin, Y.-H., Huang, H.-E., Chen, Y.-R., Liao, P.-L., Chen, C.-L., and Feng, T.-Y. 2011. C-Terminal Region of Plant Ferredoxin-Like Protein Is Required to Enhance Resistance to Bacterial Disease in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 101:741-749.
- Liu, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A.K. 1994. Nucleotide sequence, organization and expression of *rdgA* and *rdgB* genes that regulate pectin lyase production in the plant pathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in response to DNA-damaging agents. *Molecular Microbiology* 14:999-1010.
- Livaja, M., Zeidler, D., von Rad, U., and Durner, J. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* 213:161-171.
- Llama-Palacios, A., Lopez-Solanilla, E., and Rodriguez-Palenzuela, P. 2005. Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: Involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *Journal of Bacteriology* 187:2157-2162.
- Llama-Palacios, A., Lopez-Solanilla, E., Poza-Carrion, C., Garcia-Olmedo, F., and Rodriguez-Palenzuela, P. 2003. The *Erwinia chrysanthem* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Molecular Microbiology* 49:347-357.
- Lochman, J., and Mikes, V. 2006. Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Molecular Biology* 62:43-51.
- Lojkowska, E., Masclaux, C., Boccara, M., Robertbaudouy, J., and Hugouvieuxcottepattat, N. 1995. Characterization of the *peLL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 16:1183-1195.
- Lu, H., Wan, Q., Wang, H., Na, X., Wang, X., and Bi, Y. 2012. Oxidative stress and mitochondrial dysfunctions are early events in narciclasine-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Physiologia Plantarum* 144:48-58.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J., Glasner, J.D., Perna, N.T., Kelman, A., and Charkowski, A.O. 2007. Host range and molecular Phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *dickeya*. *Phytopathology* 97:1150-1163.
- Ma, W., Smigel, A., Verma, R., and Berkowitz, G.A. 2009. Cyclic nucleotide gated channels and related signaling components in plant innate immunity. *Plant Signaling & Behavior* 4:277-282.
- Mäe, A., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. 1995. Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celV1* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *Molecular and General Genetics MGG* 247:17-26.

- Mahmoudi, E., Tabatabaei, B.E.S., and Venturi, V. 2011a. Virulence Attenuation of *Pectobacterium carotovorum* Using N-Acyl-homoserine Lactone Degrading Bacteria Isolated from Potato Rhizosphere. *Plant Pathol. J.* 27:242-248.
- Mahmoudi, E., Ahmadi, A., Sayed-Tabatabaei, B.E., Ghobadi, C., Akhavan, A., Hasanzadeh, N., and Venturi, V. 2011b. A novel AHL-degrading rhizobacterium quenches the virulence of *pectobacterium atrosepticum* on potato plant. *Journal of Plant Pathology* 93:587-594.
- Marchal N, Bourdon J.L, and C, R. 1982. Les Milieux de culture : Pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, ebook 1982:1-482.
- Martin, K.R., and Barrett, J.C. 2002. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human & Experimental Toxicology* 21:71-75.
- McAinsh, M.R., and Pittman, J.K. 2009. Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181:275-294.
- McEvoy, J.L., Murata, H., and Chatterjee, A.K. 1990. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. *Journal of Bacteriology* 172:3284-3289.
- Merrell, D.S., Hava, D.L., and Camilli, A. 2002. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 43:1471-1491.
- Meyer, A., Pühler, A., and Niehaus, K. 2001. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213:214-222.
- Milena, R. 2005. Phosphoprotein changes in *Arabidopsis thaliana* cells in response to elicitation by lipopolysaccharides. University of johannesburg, 05:06-210.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, H.S.o.F.a.U.o. Geneva, ebooks, 1-468
- Mishina, T.E., and Zeier, J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 50:500-513.
- Mitrophanov, A.Y., and Groisman, E.A. 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development* 22:2601-2611.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangl, J.L., and Grant, S.R. 2007. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiology* 15:363-371.
- Moreau, M., Orange, N., and Brisset, J.L. 2005. Application of electric discharges at atmospheric pressure and ambient temperature for bio-decontamination. *Ozone-Science & Engineering* 27:469-473.
- Mulholland, V., Hinton, J.C.D., Sidebotham, J., Toth, I.K., Hyman, L.J., Perombelon, M.C.M., Reeves, P.J., and Salmond, G.P.C. 1993. A pleiotropic reduced virulence (Rvi-) mutant of *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal bacterial pathogens. *Molecular Microbiology* 9:343-356.

- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59:501-520.
- Murakami, E.-i., Nagata, M., Shimoda, Y., Kucho, K.-i., Higashi, S., Abe, M., Hashimoto, M., and Uchiumi, T. 2011. Nitric Oxide Production Induced in Roots of *Lotus japonicus* by Lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti*. *Plant and Cell Physiology* 52:610-617.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., and Bertheau, Y. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2228-2235.
- Neeno-Eckwall, E.C., Kinkel, L.L., and Schottel, J.L. 2001. Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian Journal of Microbiology* 47:332-340.
- Nemchinov, L.G., Shabala, L., and Shabala, S. 2008. Calcium Efflux as a Component of the Hypersensitive Response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant and Cell Physiology* 49:40-46.
- Newman, M.-A., Von Roepenack, E., Daniels, M., and Dow, M. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* 1:25-31.
- Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A., and Parrilli, M. 2007. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research* 13:69-84.
- Newman, M.-A., Von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., and Dow, J.M. 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal* 29:487-495.
- Newman, M.A., Daniels, M.J., and Dow, J.M. 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Induces Defense-Related Gene Expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:778-780.
- Newman, M.A., Dow, J.M., and Daniels, M.J. 2001. Bacterial Lipopolysaccharides And Plant—pathogen Interactions. *European Journal of Plant Pathology* 107:95-102.
- Oh, C.-S., and Martin, G.B. 2011. Tomato 14-3-3 Protein TFT7 Interacts with a MAP Kinase Kinase to Regulate Immunity-associated Programmed Cell Death Mediated by Diverse Disease Resistance Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 286:14129-14136.
- Palavan-Unsal, N., and Arisan, D. 2009. Nitric Oxide Signalling In Plants. *Botanical Review* 75:203-229.
- Palmer, A.G., Streng, E., and Blackwell, H.E. 2011. Attenuation of Virulence in Pathogenic Bacteria Using Synthetic Quorum-Sensing Modulators under Native Conditions on Plant Hosts. *Acs Chemical Biology* 6:1348-1356.
- Pasco, C. 2005. Comportement variétal de pomme de terre vis-à-vis des pourritures molles et de la jambe noire : test au champ et en conditions contrôlées. *Cahier des Techniques de l'INRA Bulletin de Liaison Interne (spécial)*, 4:177-181.



- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G., and Ryan, C.A. 2008. Structure-activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response. *Peptides* 29:2083-2089.
- Perez, J.C., and Groisman, E.A. 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* 63:283-293.
- Perombelon, M.C.M., and Kelman, A. 1980. Ecology of the Soft Rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* 18:361-387.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Piater, L.A., NÜrnberger, T., and Dubery, I.A. 2004. Identification of a lipopolysaccharide responsive erk-like MAP kinase in tobacco leaf tissue. *Molecular Plant Pathology* 5:331-341.
- Pieterse, C.M.J., vanWees, S.C.M., Hoffland, E., vanPelt, J.A., and vanLoon, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., Ton, J., Van Wees, S.C.M., Leon-Kloosterziel, K.M., and Van Loon, L.C. 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35:39-54.
- Pike, S.M., Adam, A.L., Pu, X.A., Hoyos, M.E., Laby, R., Beer, S.V., and Novacky, A. 1998. Effects of *Erwinia amylovora* harpin on tobacco leaf cell membranes are related to leaf necrosis and electrolyte leakage and distinct from perturbations caused by inoculated *E. amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53:39-60.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.B., and Palva, E.T. (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis., M.P. *Interact.*, ed, pp. 276-283.
- Pissavin, C., RobertBaudouy, J., and HugouvieuxCottePattat, N. 1996. Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* 178:7187-7196.
- Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y.S., and Kweon, J.H. 2010. 2(5h)-furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:227-234.
- Priou, S., and Jouan, B. 1996. Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. INRA éditions 5:260-265.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. 1997. Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *The Plant Cell Online* 9:2077-2091.
- Qiu, J.L., Jin, Q.L., Liu, N.Z., and Wang, J. 1999. Involvement of anion channel in signal transduction of early defense responses elicited by harpinPss in tobacco. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 32(1):88-92.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20:1-11.

- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J.-P., Haapalainen, M., Barny, M.-A., and Bouteau, F. 2007a. Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 120:3271-3278.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Laroche, S., Rona, J.P., Barny, M.A., and Bouteau, F. 2007b. The HrpN(ea) harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Mol Plant Microbe In* 20:94-100.
- Reddy, A.S.N. 2001. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science* 160:381-404.
- Reddy, A.S.N., Ali, G.S., Celesnik, H., and Day, I.S. 2011. Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell Online* 23:2010-2032.
- Reina-Pinto, J.J., and Yephremov, A. 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:540-549.
- Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., and Buell, C.R. 2005. Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* 48:598-605.
- Reuhs, B.L., Kim, J.S., and Matthysse, A.G. 1997. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. *Journal of Bacteriology* 179:5372-5379.
- Reverchon, S., Huang, Y., Bourson, C., and Robertbaudouy, J. 1989. Nucleotide sequences of the *Erwinia chrysanthemi* *ogl* and *pelE* genes negatively regulated by the *kdgR* gene product. *Gene* 85:125-134.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., and Mundy, J. 2010. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:621-49.
- Ross, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358.
- Rost, M., Karge, E., and Klinger, W. 1998. What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? 1. Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 13:355-363.
- Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J.-C. 1996. La pomme de terre. coll. « Mieux comprendre » Paris, ebook, INRA, ISBN 2-7380-0676-0.
- Ryan, C.A., Huffaker, A., and Yamaguchi, Y. 2007. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cellular Microbiology* 9:1902-1908.
- S. Henry Ayers. 1919. A Study of the Alkali-forming Bacteria Found in Milk. Washington, D.C. - US Dept of Agriculture. ebook 782:39.
- Saarilahti, H.T., Henrissat, B., and Palva, E.T. 1990a. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Gene* 90:9-14.
- Saarilahti, H.T., Heino, P., Pakkanen, R., Kalkkinen, N., Palva, I., and Palva, E.T. 1990b. Structural analysis of the *pehA* gene and characterization of its protein product, endopolygalacturonase, of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *Molecular Microbiology* 4:1037-1044.

- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., and de Oliveira, D.E. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1492:1-14.
- Sagi, M., and Fluhr, R. 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* 141:336-340.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Saux, M.F.-L., Achouak, W., and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1415-1427.
- Sanabria, N., Goring, D., Nuernberger, T., and Dubery, I. 2008. Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytologist* 178:503-513.
- Sandkvist, M. 2001. Type II Secretion and Pathogenesis. *Infection and Immunity* 69:3523-3535.
- Schaad, N., Jones, J., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS,ebook, 3:1-398
- Schulze, W.X. 2010. Proteomics approaches to understand protein phosphorylation in pathway modulation. *Current Opinion in Plant Biology* 13:279-286.
- Sedegui, M., Carroll, R.B., Morehart, A.L., Evans, T.A., Kim, S.H., Lakhdar, R., and Arifi, A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* 84:173-176.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., and Nagano, T. 2003. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* 278:3170-3175.
- Shevchik, V.E., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 24:1285-1301.
- Shevchik, V.E., RobertBaudouy, J., and HugouvieuxCottePattat, N. 1997. Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *Journal of Bacteriology* 179:7321-7330.
- Shevchik, V.E., Condemine, G., HugouvieuxCottePattat, N., and RobertBaudouy, J. 1996. Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 19:455-466.
- Shevchik, V.E., Kester, H.C.M., Benen, J.A.E., Visser, J., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, M. 1999. Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* 181:1652-1663.
- Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. 2000. Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44:371-385.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R.S., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F.X., and Li, W.H. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* 16:1220-1234.

- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.-A., and Parrilli, M. 2005. The Elicitation of Plant Innate Immunity by Lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biological Chemistry* 280:33660-33668.
- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B., and Tuteja, N. 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* 6:196-203.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *International journal of systematic bacteriology* 30:225-420.
- Snaiki, J., Nadif, A., and Ouhssine, M. 2005. Détection de deux pathotypes d'*Erwinia* causant la maladie de la pourriture molle sur la betterave à sucre dans la plaine du Gharb au Maroc. *EPPO Bulletin* 35:537-540.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., Garcia-Mata, C., Lamattina, L., and Blatt, M.R. 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *The Plant Journal* 43:520-529.
- Spoel, S.H., and Dong, X. 2008. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe* 3:348-351.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P.J.G.M. 2009. Fungal Effector Proteins. *Annu Rev Phytopathol.* 47:233-63.
- Sticher, L., MauchMani, B., and Metraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Stulemeijer, I.J.E., Stratmann, J.W., and Joosten, M.H.A.J. 2007. Tomato Mitogen-Activated Protein Kinases LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 Are Activated during the Cf-4/Avr4-Induced Hypersensitive Response and Have Distinct Phosphorylation Specificities. *Plant Physiology* 144:1481-1494.
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. 2004. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Do Not Elicit Hypersensitive Cell Death but Induce Apoptosis in the Adjacent Cells During the Defense Response of Oat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:245-253.
- Tameling, W.I.L., and Takken, F.L.W. 2008. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *European Journal of Plant Pathology* 121:243-255.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.-M. 2006. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1159-1166.
- Terta, M., El Karkouri, A., Ait M'hand, R., Achbani, E., Barakate, M., Amdan, M., Annajar, B., El Hassouni, M., Val, F., Bouteau, F., and Ennaji, M.M. 2010. Occurrence OF *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 56 Suppl:OL1324-1333.
- Thomson, S.V., Hildebrand, D.C., and Schroth, M.N. 1981. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugarbeet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology*, 10:1037-1042
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378.
- Toth, I.K., and Birch, P.R.J. 2005. Rotting softly and stealthily. *Current Opinion in Plant Biology* 8:424-429.

- Toth, I.K., Hyman, L.J., and Wood, J.R. 1999a. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology* 87:158-166.
- Toth, I.K., Avrova, A.O., and Hyman, L.J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4070-4076.
- Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., and Birch, P.R.J. 2003a. Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4:17-30.
- Toth, I.K., Thorpe, C.J., Bentley, S.D., Mulholland, V., Hyman, L.J., Perombelon, M.C.M., and Salmond, G.P.C. 1999b. Mutation in a Gene Required for Lipopolysaccharide and Enterobacterial Common Antigen Biosynthesis Affects Virulence in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:499-507.
- Toth, I.K., Sullivan, L., Brierley, J.L., Avrova, A.O., Hyman, L.J., Holeva, M., Broadfoot, L., Perombelon, M.C.M., and McNicol, J. 2003b. Relationship between potato seed tuber contamination by *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*, blackleg disease development and progeny tuber contamination. *Plant Pathology* 52:119-126.
- Toth, I.K., Bertheau, Y., Hyman, L.J., Laplaze, L., López, M.M., McNicol, J., Niepold, F., Persson, P., Salmond, G.P.C., Sletten, A., Van Der Wolf, J.M., and Pérombelon, M.C.M. 1999c. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Applied Microbiology* 87:770-781.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13:459-465.
- Val, F., Desender, S., Bernard, K., Potin, P., Hamelin, G., and Andrivon, D. 2008. A Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Primes Defense Reaction in Potato Cell Suspensions. *Phytopathology* 98:653-658.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70:1581-1588.
- Van der Hoorn RA, De Wit PJ, and Joosten MH. 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci*, 7: 67-71.
- Van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S., and Schlegel, W. 1999. Calcium Signalling and Gene Expression. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 19:481-492.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:895-908.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditzjawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J. 1994. Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal

- Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell* 6:959-965.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., deBruijn, F.J., and Lupski, J.R. 1996. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequenced based PCR (rep-PCR)., *Methods in Molecular Medicine*, 15:103-115.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F., and Park, S.-W. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11:436-442.
- Vranova, E., Inze, D., and Van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1227-1236.
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J.W., Forsyth, A., Mitchell, K., Bastas, K., Liu, C.-M., Woods-Toer, A., Zipfel, C., de Wit, P.J.G.M., Jones, J.D.G., Toer, M., and Thomma, B.P.H.J. 2008. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 147:503-517.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., and Hetherington, A.M. 1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Adv Bot Res* 22:45-96.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7:449-455.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14:1937-1951.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., and Salmond, G.P.C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47:9-27.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., and Hancock, J.T. 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* 31:622-631.
- Yaganza, E.-S. 2005. Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique, F. Université Laval, 3:56-63.
- Yaganza, E.S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J., and Tweddell, R.J. 2004. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6800-6808.
- Yang, K.Y., Liu, Y.D., and Zhang, S.Q. 2001. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *P Natl Acad Sci USA* 98:741-746.
- Yoshida, A., Matsuo, Y., Kamio, Y., and Izaki, K. 1992. Molecular cloning and sequencing of the extracellular pectate lyase II gene from *Erwinia carotovora* Er. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56:1596-1600.

- Yoshida, A., Izuta, M., Ito, K., Kamio, Y., and Izaki, K. 1991. Cloning and characterization of the pectate lyase III gene of *Erwinia carotovora* Er. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:933-940.
- Yu, S.P., and Choi, D.W. 2000. Ions, cell volume, and apoptosis. *P Natl Acad Sci USA* 97:9360-9362.
- Zabłocka, A., and Janusz, M. 2008. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 62:118-24.
- Zamioudis, C., and Pieterse, C.M.J. 2012. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:139-150.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15811-15816.
- Zhang, C., Czymbek, K.J., and Shapiro, A.D. 2003. Nitric oxide Does Not Trigger Early Programmed Cell Death Events but May Contribute to Cell-to-Cell Signaling Governing Progression of the *Arabidopsis* Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:962-972.
- Zhang, H., Wang, W., Yin, H., Zhao, X., and Du, Y. 2012. Oligochitosan induces programmed cell death in tobacco suspension cells. *Carbohydrate Polymers* 87:2270-2278.
- Zhang, J., and Zhou, J.-M. 2010. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant* 3:783-793.
- Zhang, L., Jia, C., Liu, L., Zhang, Z., Li, C., and Wang, Q. 2011. The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin-induced tomato cell death. *Journal of Experimental Botany* 62:5405-5418.
- Zhou, J., Xing, D., and Chen, Q. 2006. Enhancement of Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog Chemiluminescence by Human Serum Albumin for Singlet Oxygen Detection. *Photochemistry and Photobiology* 82:1058-1064.
- Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I., and Raetz, C.R.H. 2001. Lipid A Modifications in Polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* 276:43111-43121.
- Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20:10-16.
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 12:414-420.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749-760.

# ANNEXES



## **Annexe 1 : Protocole expérimental de l'identification moléculaire des souches de *Pectobacterium*.**

### **Echantillonnage et identification phénotypique et moléculaire des *Pectobacterium*.**

Des collectes de tubercules de pomme de terre présentant des symptômes de pourriture molle ont été effectuées en vue d'évaluer la prévalence de *Pectobacterium* sp. dans la région du Grand Casablanca. Vingt-cinq échantillons de tubercules (cv. Désirée) ont été traités, ce qui correspond à environ 4 tubercules par échantillon. Tous les tubercules sont lavés puis désinfectés à l'eau de javel 5%, puis conservés à + 4°C pour les analyses microbiologiques, biochimiques et moléculaires ultérieures.

Les tests biochimiques et microbiologiques utilisés, ainsi que leurs objectifs sont décrits dans le tableau 1 du chapitre 1.

### **Confirmation moléculaire des *Pectobacterium* sp.**

L'appartenance des souches identifiées par les tests biochimiques et microbiologiques à l'espèce *Pectobacterium carotovorum* a été confirmée par comparaison de séquences nucléotidiques au moyen de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction – PCR). Cette technique d'amplification in vitro permet d'amplifier les séquences d'ADN de manière spécifique et permet ainsi d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN initiale. En utilisant des amorces spécifiques aux gènes *pelY* et *pmrA*, Ces deux gènes sont connues par leur participation à la virulence de la bactérie (Darrasse et al., 1994; Hyytiainen et al., 2003). Le gène *pelY* permet de confirmer l'appartenance des souches à l'espèce *P. carotovorum* (Darrasse et al. 1994), tandis que le gène *pmrA* peut être utilisé comme outil de discrimination entre les sous espèces de *Pectobacterium* sp. (Hyytiainen et al., 2003). Les résultats d'amplification donnent pour chaque souche, un amplicon de 434 pb pour le gène *pelY* et de 666 pb pour le gène *pmrA*.

### **Extraction d'ADN**

L'extraction de l'ADN est réalisée sur 700 µL de suspension bactérienne  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> d'une culture de 24h, en utilisant la méthode de Li et De Boer (1995). Les suspensions bactériennes sont centrifugées à 12000 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est repris dans 100 µL d'acétone

pure à -20°C pendant 1 h puis à température ambiante pendant 10 min, puis remis en suspension dans 500 µL de tampon TE (Tris-EDTA 10 mM/1 mM). Cinquante microlitres d'EDTA (250 mM), 50 µL de SDS (14%) et 10 µL de protéinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>) sont alors ajoutés. Le mélange réactionnel est incubé à 56°C pendant 1 h. Un volume égal de 7,5 M d'acétate d'ammonium est ajouté suivi d'une centrifugation à 12000 g pendant 30 min à 4°C afin de séparer les débris cellulaires de l'ADN bactérien. Un volume égal de surnageant cette fois ci (600 µL) est récupéré dans de l'isopropanol puis incubé à -20°C pendant 30 min, centrifugé après à 12000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70% et précipité une deuxième fois par centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4°C. Enfin, le culot contenant l'ADN est séché à température ambiante et mis en suspension dans 50 µL de tampon TE (pH= 8). Les extraits d'ADN sont alors conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### Amplification PCR

La quantification et la qualification de l'ADN extrait est effectuée sur NanoDrop 8000. Une concentration de 100 ng.µL<sup>-1</sup> d'ADN est utilisée comme matrice pour chaque réaction de PCR. Deux paires d'amorces ont été utilisées : Y1 (5'-GAC TTA GCC GAG CTG GCC TGG CGT-3') et Y2 (5'-ACG GAA GAT GTC GTT GCG AGT ATC-3') permettant l'amplification du gène *pelY* (Darrasse et al., 1994) et F0145 (5'-TAC CCT GCA GAT GAA ATT ATT GAT TGT TGA AGA C-3') et E2477 (5'-TAC CAA GCT TTG GTT GTT CCC CTT TGG TCA-3') pour l'amplification du gène *pmrA* (Hyytiainen et al., 2003). Le mélange réactionnel de la PCR pour chaque échantillon a été composé de : 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 2,5 µL de tampon (1X), 2 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,2 µL de Taq polymérase (0,04 U.µL<sup>-1</sup>), 1 µL de chaque amorce (0,4 µM) et enfin 1µL d'ADN génomique est ajouté à ce mélange. Les cycles d'amplification des deux gènes (*pelY* et *pmrA*) ont été réalisés comme suit :

Cycle		<i>pelY</i>		<i>pmrA</i>	
35 cycles	Dénaturation initiale	95°C	5 min	94°C	5 min
	Dénaturation	94°C	30 s	94°C	1 min
	Hybridation	55°C	30 s	55°C	1 min
	Elongation	72°C	45 s	72°C	2 min
	Elongation finale	72°C	7 min	72°C	10 min
Conservation à 4°C					

## Détection de l'ADN amplifié

Les produits PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,8% contenant  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Bromure d'éthidium (BET). Dix microlitres de produit PCR sont déposés dans chaque puits du gel. La taille des amplicons est révélée par un marqueur de taille de 1 Kpb. L'ADNg de *P. carotovorum* a été utilisé comme témoin positif et l'eau comme témoin négatif.

## Séquençage des produits de PCR du gène *pmrA*

- *Purification produits PCR*

Les produits PCR positifs sont ensuite purifiés afin d'éliminer les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR. Pour cela, un Kit de purification (ExoSAP-IT) a été utilisé. Dans une plaque de réaction contenant  $5 \mu\text{L}$  de produits PCR par puits,  $2 \mu\text{L}$  de l'ExoSAP-IT sont ajoutés puis incubés dans un thermocycleur en deux temps. La première incubation (15 min à  $37^\circ\text{C}$ ) permet de dégrader les amorces et les nucléotides libres, la deuxième (15 min à  $80^\circ\text{C}$ ) permet d'inactiver l'ExoSAP-IT. A la fin de cette réaction les produits PCR sont prêts à être séquencés.

- *Réaction de séquence*

Pour la réaction de séquence, un mélange réactionnel de  $10 \mu\text{L}$  est préparé. Ce mélange contient:  $1 \mu\text{L}$  du BigDye Terminator v3.1,  $2 \mu\text{L}$  du tampon de séquençage (5X),  $0,5 \mu\text{L}$  de chaque amorce ( $10\mu\text{M}$ ),  $2 \mu\text{L}$  d'ADN et  $4,5 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q). Il est ensuite transféré dans une plaque de réaction 96 puits et placé dans un thermocycleur. Le programme appliqué à ce dernier est le suivant :

Cycle		<i>pmrA</i>	
25 cycles	Dénaturation initiale	$96^\circ\text{C}$	1 min
	Dénaturation	$96^\circ\text{C}$	10 s
	Hybridation	$50^\circ\text{C}$	5 s
	Elongation	$60^\circ\text{C}$	4 min
	Elongation finale	$60^\circ\text{C}$	5 min
Conservation à $4^\circ\text{C}$			

---

- *Purification par BigDye X Terminator purification kit*

La dernière étape avant le séquençage du gène *pmrA* est la purification des produits de la réaction de séquence. Cette purification par gel-filtration utilise une résine Sephadex® G50 qui permet de dé-saler les échantillons et d'éliminer les nucléotides (ddNTPs et dNTPs) non incorporés et les amorces de PCR en excès. Une plaque de 96 puits MultiScreen MSHAN45 (Millipore) est utilisée comme support inerte de la résine G50. Le protocole expérimental consiste à distribuer en premier temps 300 µL de G50 dans chaque puits de la microplaque. Après centrifugation à 1500 g pendant 3 min, la G50 est redistribuée de manière à avoir un volume final de 600 µL. Dans un second temps et après l'ajout de 20 µL de H<sub>2</sub>O (Milli-Q) aux produits de la réaction de séquence, 30 µL de ces produits sont déposés au milieu de chaque puits pour une dernière centrifugation de 5 min à 1100 g. Les échantillons sont ensuite installés dans le séquenceur 3130XL - 16 capillaires (Applied Biosystems).

- *Analyse et interprétation des résultats*

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel (Sequencing Applied 5.2) puis comparées à une séquence de référence en utilisant le programme BLAST. Ces séquences ont été alignées par le programme Clustal W (Larkin et al., 2007), puis les alignements ont été corrigés à la main pour résoudre toute anomalie due au chevauchement de pics correspondants aux différentes bases nucléiques. Le dendrogramme a été réalisé en utilisant le programme MEGA (Tamura et al., 2011).

## **Annexe 2 : Méthodologie expérimentale de détection de niveau d'agressivité des souches de *Pectobacterium carotovorum*.**

### *Cultures cellulaires d'Arabidopsis thaliana*

Nous avons fait nos expériences sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* écotype *columbia*. Ces cellules sont mises en culture dans un milieu contenant : 3.1 g/L du Gamborg ; 30 g/L de Saccharose ; 200 µl/L de l'ANA ; pH= 5.8. Elles sont maintenues à  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , sous agitation permanente (120 rpm) durant 4 jours et sous une lumière blanche 40 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### *Quantification de la mort cellulaire*

La mort cellulaire est déterminée au moyen d'un colorant vital, le bleu Evans. Ce colorant est rejeté activement par les cellules vivantes; les cellules mortes, quant à elles, l'accumulent et apparaissent ainsi colorées. Lors de nos expériences, les cellules sont incubées 24h à  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sous agitation en présence du *Pectobacterium carotovorum* à deux concentrations différentes  $10^4$  et  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>, dans des tubes Eppendorf, préalablement troués pour éviter la mort des cellules par anoxie. Pour chaque condition, 100 µL de suspension cellulaire infectée sont ajoutés à 900 µL de tampon phosphate (0.5M ; pH=7) avec 1 µL de bleu Evans (concentration finale : 0.001%) ; le tout est mis à incuber pendant 10 minutes, sous agitation. La quantification est faite sous microscope optique à grossissement (32x10): 500 cellules sont comptées au total pour chaque condition.

### *Mesure de l'activité enzymatique des pectate lyases*

L'activité pectinolytiques est mesurée en surveillant le taux d'oligogalacturonates (composés à 4 ou 5 carbones) accumulé dans le milieu après dégradation du Sodium polypéctate ou polygalacturonate (PGA).

L'expérimentation est réalisée dans 750 µL de substrat (0.5% PGA) et le même volume de la solution des enzymes repartie comme suit : 200 µL de surnageant contenant les pectate-lyase, 37.5 µL de CaCl<sub>2</sub> ( $5.10^{-4}$  M) et 512.5 µL de Tris-HCl (0.1 M) à pH 8.5. Après une heure d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par choc thermique de 100°C pendant 20 minutes et le produit de dégradation du PGA est mesuré à 235 nm.

### *Mesure de la fuite des électrolytes*

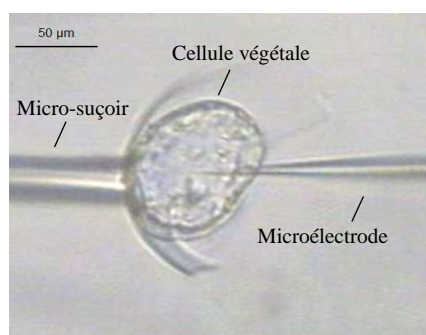
La mesure de la conductivité des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* infectées par les différentes souches du *Pectobacterium carotovorum* permet de mettre en évidence la fuite des électrolytes. Les mesures sont effectuées chaque 2h, sur les surnageants des suspensions cellulaires infecté par  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> du pathogène à l'aide de SevenMulticonductimeter.

#### *Test de pathogénicité sur tranches de pomme de terre*

Des tubercules de pomme de terre fraîchement récoltés sont lavés à l'eau de robinet et coupés stérilement en rondelle. Les souches de *P. carotovorum* 132C, 1349, 1359, 1351 et CFPB5980 sont incubées 24h à 27°C sur milieu LPGa et différentes concentrations sont préparées  $10^2$ ,  $10^4$  or  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Douze rondelles de pomme de terre sont inoculées par les différentes concentrations préparées, puis incubées à 30°C pendant 24h. La nature ainsi que le diamètre de pourriture sont quantifiés.

### **Annexe 3 : Principe du Voltage clamp dans l'étude des variations des canaux ioniques**

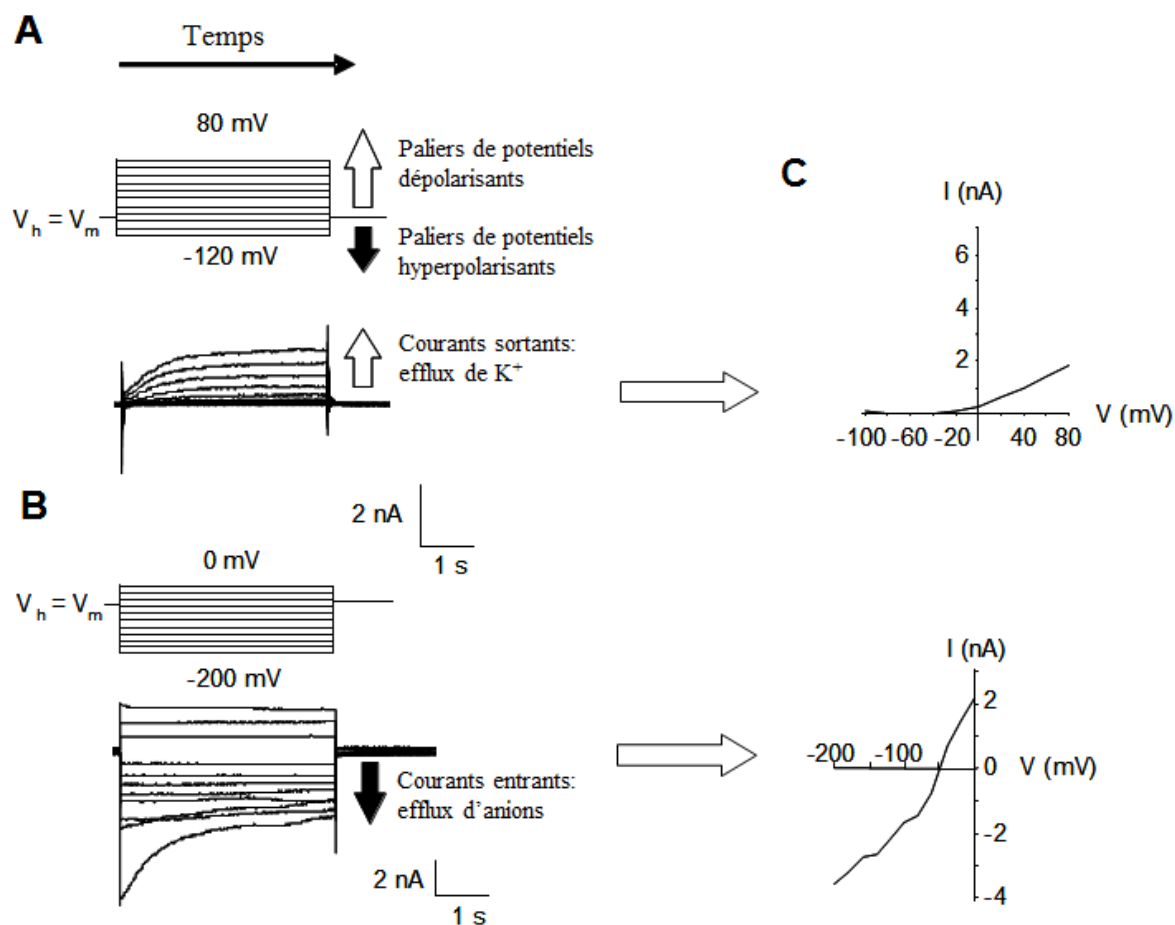
Les canaux ioniques assurent le transfert des ions, dans le sens de leur gradient électrochimique, d'un compartiment à un autre. La probabilité d'ouverture/fermeture de ces canaux dépend de la nature du signal éliciteur. Deux techniques permettent de mesurer l'activité des canaux ioniques chez les cellules végétales : le patch clamp et le voltage imposé à électrode. Le patch clamp impose de travailler avec des protoplastes, dont la préparation nécessite l'élimination de la paroi végétale. Ce traitement est susceptible d'activer les voies de transduction du signal impliquées dans les réponses de défense de la cellule et ne permet pas, d'une façon générale, l'enregistrement de modifications d'activité des canaux ioniques en réponse aux éliciteurs. En revanche, les mesures de voltage imposé à une électrode se font sur des cellules entières (figure 1 et 2). Cette technique permet de suivre les variations de la différence de potentiel transmembranaire et l'activité des canaux ioniques de la membrane plasmique sur des cellules vivantes (paroi cellulaire conservé et milieu interne non contrôlé). L'étude de l'implication des canaux ioniques dans les phénomènes mettant en jeu la perception des éliciteurs repose donc principalement sur les mesures de flux ioniques au travers de la membrane plasmique (Reboutier et al., 2007b)



**Figure 1. Cellule végétale vivante fixée par un micro-suçoir et empalée par une microélectrode.**

La majorité des informations sur les canaux ioniques étudiés chez les plantes concernent des canaux localisés dans la membrane plasmique, qu'il s'agit de canaux cationiques ou anioniques. Ces canaux jouent un rôle clé dans le contrôle du métabolisme, dans l'entretien

des gradients électrochimiques et dans les voies de signalisation conduisant à l'adaptation des plantes aux différents stress biotiques et abiotiques.



**Figure 2. Enregistrement de courants ioniques au travers de la membrane plasmique par la technique de voltage imposé à une électrode.**

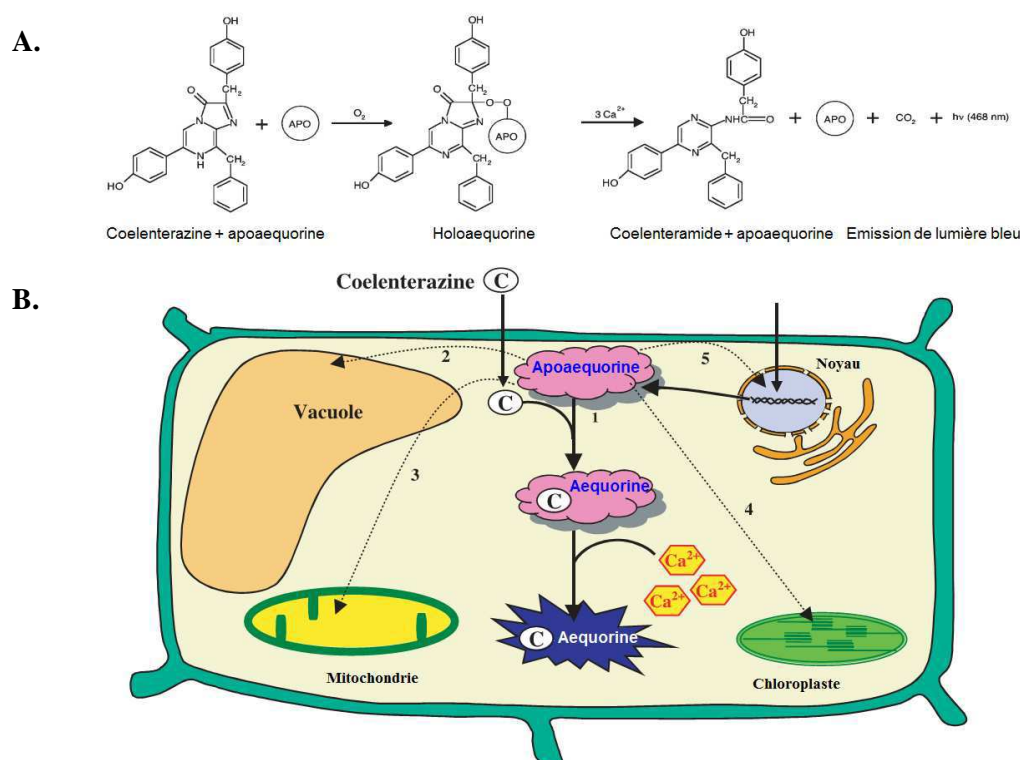
**A.** Exemple de protocole des voltages imposés (en haut) et de courants  $K^+$  enregistrés (en bas) suite à l'imposition des différents paliers de voltage. **B.** Exemple de protocole des voltages imposés (en haut) et de courants anioniques enregistrés (en bas) suite à l'imposition des différents paliers de voltage. **C.** courbe d'intensité du courant en fonction du voltage (I-V) à un temps donné.

L'utilisation combinée d'approches pharmacologiques et électrophysiologiques a permis de caractériser la liaison entre l'activité des canaux et les différents événements de signalisation observés en réponse à un signal éliciteur.



## Annexe 4 : Principe de détection du calcium cytosolique par la technologie aequorine

L'utilisation de sondes à calcium à base de protéines et en particulier la technologie aequorine cytosolique et nucléaire (figure 1) a permis une meilleure compréhension du rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la transduction du signal éliciteur (Dikici et al., 2009).



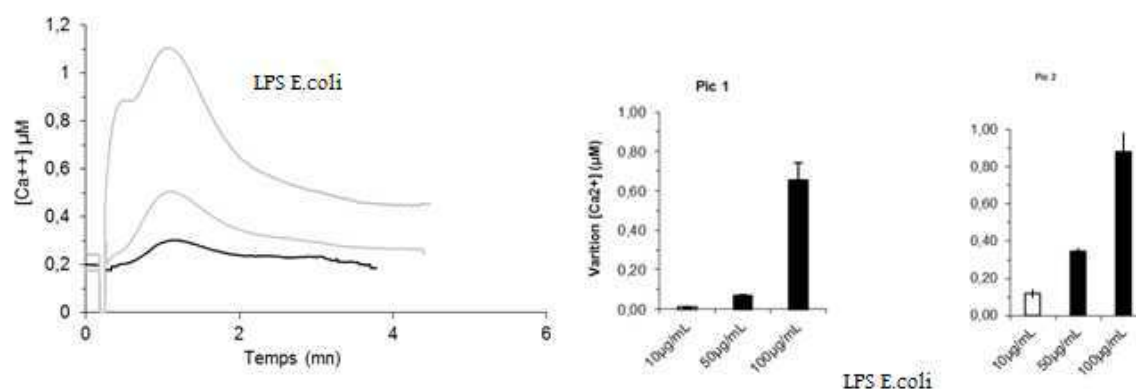
**Figure 1. Mesure des concentrations intracellulaires de calcium libres dans la cellule végétale en utilisant la technologie aequorine, d'après (Lecourieux et al., 2006).**

**A.** Mécanisme d'émission de lumière bleu par le complexe apoequorine coelenteramide. **B.** Adressage de l'aequorine dans la cellule végétale. Bien que l'aequorine puisse être introduite dans les cellules végétales en utilisant la micro-injection directe, elle est généralement introduite par des techniques de transformation stables. Les flèches en pointillées de 1 à 5 indique les sites d'expression stable de l'aequorine.

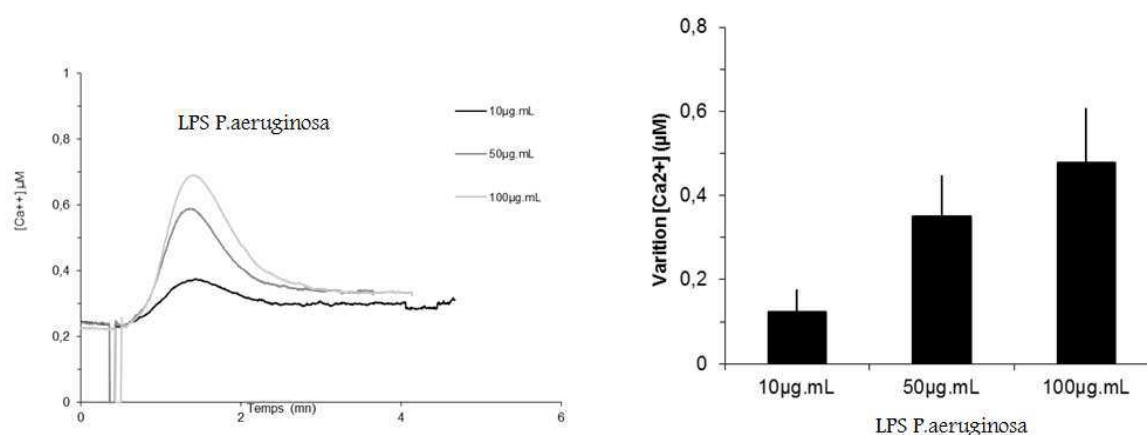
L'adressage de l'aequorine vers le noyau, a permis de montrer que des éliciteurs de réactions de défense étaient aussi capables d'induire une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]$  nucléaire (Lecourieux et al., 2006). De même, plusieurs études ont montré que cette variation nucléaire est autonome et indépendante de celle du cytoplasme. (O'Malley et al., 2003; Wang and Sihra, 2004; Kumar et al., 2008; Mazars et al., 2008).

## Annexe 5 : Induction du calcium cytosolique par les LPS de bactéries non phytopathogène chez *Nicotiana tabacum* (BY2)

A.



B.



**Figure 1 : Variation du calcium cytosolique induite par les LPS de bactéries non phytopathogènes.**

**A.** Induction du calcium cytosolique chez une culture cellulaire de tabac en réponse à différentes concentration (10, 50 et 100 μg.mL<sup>-1</sup>) de LPS de *E. coli*. **B.** Induction du calcium cytosolique chez une culture cellulaire de tabac en réponse à différentes concentration (10, 50 et 100 μg.mL<sup>-1</sup>) de LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.

## Annexe 6 : Article joint

### **Calcium- and ROS-mediated defence responses in BY2 tobacco cells by nonpathogenic *Streptomyces* sp.**

M. Baz, D. Tran, **M. Kettani-Halabi**, S.E. Samri, A. Jamjari, B. Biligui, P.  
Meimoun, H. El- Maarouf-Bouteau, M. Garmier, P. Saindrenan, M.M. Ennaji, M.  
Barakate and F. Bouteau

Published in Journal of Applied Microbiology 112, 782–792 – 2012.

## ORIGINAL ARTICLE

# Calcium- and ROS-mediated defence responses in BY2 tobacco cells by nonpathogenic *Streptomyces* sp

M. Baz<sup>1,2</sup>, D. Tran<sup>1</sup>, M. Kettani-Halabi<sup>1,3</sup>, S.E. Samri<sup>2</sup>, A. Jamjari<sup>2</sup>, B. Biligui<sup>1</sup>, P. Meimoun<sup>1,4</sup>, H. El-Maarouf-Bouteau<sup>4</sup>, M. Garmier<sup>5</sup>, P. Saindrenan<sup>5</sup>, M.M. Ennaji<sup>3</sup>, M. Barakate<sup>2</sup> and F. Bouteau<sup>1</sup>

1 LEM, Institut de Biologie des Plantes, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Orsay, France

2 LBBM, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco

3 LVHM, Université Hassan II Mohammedia-FSTM, Mohammedia, Morocco

4 UPMC, UR5 – PCMP, Paris, France

5 Institut de Biologie des Plantes, UMR8618 CNRS Université Paris-Sud 11, Orsay, France

## Keywords

defence responses, elicitation,  
*Pectobacterium*, *Streptomyces* sp., tobacco.

## Correspondence

François Bouteau, LEM, Institut de Biologie des Plantes, Bât. 630, 91405 Orsay Cedex, France. E-mail: francois.bouteau@univ-paris-diderot.fr

2011/1947: received 14 November 2011,  
revised 16 January 2012 and accepted 23  
January 2012

doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05248.x

## Abstract

**Aims:** The early molecular events underlying the elicitation of plant defence reactions by Gram-positive bacteria are relatively unknown. In plants, calcium and reactive oxygen species are commonly involved as cellular messengers of a wide range of biotic stimuli from pathogenic to symbiotic bacteria. In the present work, we checked whether nonpathogenic *Streptomyces* sp. strains could induce early signalling events leading to defence responses in BY2 tobacco cell suspensions.

**Methods and Results:** We have demonstrated that nonpathogenic *Streptomyces* sp. OE7 strain induced a cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and a biphasic oxidative burst in the upstream signalling events, leading to defence responses in BY2 tobacco cell suspensions. *Streptomyces* sp. OE7 also elicited delayed intracellular free scopoletin production and programmed cell death. In agreement with scopoletin production, OE7 induced accumulation of *PAL* transcripts and increased accumulation of transcripts of *EREBP1* and *AOX* genes that are known to be regulated by the jasmonate/ethylene pathway. Transcript levels of *PR1b* and *NIMIN2α*, both salicylic acid pathway-linked genes, were not modified. Moreover, *Streptomyces* sp. OE7 culture filtrates could reduce *Pectobacterium carotovorum*- and *Pectobacterium atrosepticum*-induced death of BY2 cells and soft rot on potato slices.

**Conclusions:** New insights are thus provided into the interaction mechanisms between *Streptomyces* sp. and plants; *Streptomyces* sp. could be sensed by plant cells, and through cytosolic Ca<sup>2+</sup> changes and the generation of reactive oxygen species, defence responses were induced.

**Significance and Impact of the Study:** These induced defence responses appeared to participate in attenuating *Pectobacterium*-induced diseases in plants. Thus, *Streptomyces* sp. OE7 could be a biocontrol agent against *Pectobacterium* sp.

## Introduction

*Streptomyces* is one of the most important and versatile genera of actinobacteria that live in a wide spectrum of ecological niches (Karlovsky *et al.* 2008). In soil, *Strepto-*

*myces* spp. are able to colonize the rhizosphere and to interact with other micro-organisms and plants (Barakate *et al.* 2002; Coombs and Franco 2003), and they can even penetrate plant tissues (Franco *et al.* 2007). They produce various molecules, including proteins, peptides,



oligosaccharides and antibiotics, that are secreted and play an important role in the *Streptomyces* life cycle and their interaction with other organisms (Chater et al. 2010). Different studies have aimed to test the efficiency of *Streptomyces* sp. in the biological control against phytopathogens (El-Tarabily 2006; Errakhi et al. 2007). The impact of antagonistic *Streptomyces* sp. depends on multiple synergistic strategies, including a direct interaction with the pathogenic partner (antibiosis), as well as indirect mechanisms like the degradation of quorum-sensing signal molecules (Park et al. 2005). *Streptomyces* sp. can also induce systemic and localized resistance to pathogens and improve plant growth and metabolism (Conn et al. 2008; Lehr et al. 2008). The presence in the exudates of many molecules potentially acting as elicitors may explain the ability of these bacteria to activate systemic defence responses in plants (Lehr et al. 2008). However, there are only a few reports on the mechanisms by which plant cells perceive the secreted bacterial metabolites. During plant-microbe interactions, the exchange of molecular messages probably induces signalling pathways. Changes in cytosolic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) and the production of reactive oxygen species (ROS) are well-known components of signal transduction pathways leading to the activation of plant defence responses like the hypersensitive response (HR), a form of programmed cell death (PCD) and phytoalexin synthesis (Dodd et al. 2010). To date, the mechanisms that allow plant cells to perceive the secreted metabolites of nonpathogenic *Streptomyces* sp. have not been investigated despite their putative importance for biocontrol and/or growth stimulation. We have used tobacco BY2 cell suspensions as a simplified model system offering several advantages to carry out the dissection of complex cellular responses (Navazio et al. 2007; Terta et al. 2010; Verhagen et al. 2010). Our results indicate that plant cells can selectively perceive secreted components of *Streptomyces* sp. and that they trigger early and late responses including specific  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes, oxidative bursts, induction of defence response genes, scopoletin synthesis and PCD. These responses appear to participate in limiting the virulence of *Pectobacterium carotovorum* or *Pectobacterium atrosepticum* in suspension cells and the development of soft rot on potato tuber slices.

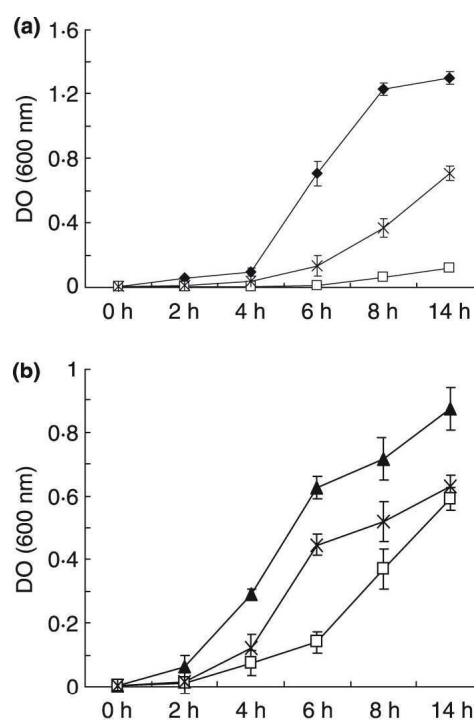
## Materials and methods

### Bacteria strains, growth conditions and preparation of culture filtrates

*Streptomyces* sp. strains OE7 and OE53 were isolated from Moroccan rhizospheric soils. The analysis of 16S rDNA sequences indicated that OE7 isolate shared 99–100% maximal sequence identity with *Streptomyces griseus* and

*Streptomyces ornatus* and that OE53 exhibited 99% maximal sequence identity to *Streptomyces puniceus* and *Streptomyces californicus* (Baz et al. 2012). Phylogenetic trees also indicate that these strains do not belong to *Streptomyces scabiei*, the pathogenic agent of common scab in potato (Baz et al. 2012). Their antimicrobial activity was evaluated by growing  $10^7$  CFU of *Pectobacterium* strains in 100 ml of liquid nutritive broth supplemented with 1 ml of *Streptomyces* sp. culture filtrates (CF) on a rotary shaker ( $200 \text{ rev min}^{-1}$ ) at  $28^\circ\text{C}$  for 14 h (Fig. 1). Actinobacteria were maintained as a spore suspension in 20% glycerol at  $-20^\circ\text{C}$ . Each isolate was grown separately in 100 ml Bennett's liquid medium (beef extract,  $1 \text{ g l}^{-1}$ ; glucose,  $10 \text{ g l}^{-1}$ ; peptone,  $2 \text{ g l}^{-1}$ ; and yeast extract,  $1 \text{ g l}^{-1}$ ) (Jones 1949) on a rotary shaker ( $250 \text{ rev min}^{-1}$ ) at  $30^\circ\text{C}$  for 7 days. This medium was shown to promote antibiotic production by some actinobacteria (Badji et al. 2007).

*Streptomyces* species were co-cultured with the referenced strains (INRA Angers, France) *P. carotovorum* (CFBP 5890) and *P. atrosepticum* (CFBP 5889) by inoculation of  $10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$  of each *Pectobacterium* strain in the end of exponential phase of *Streptomyces* sp. growth culture (5 days old) (Badji et al. 2007) to avoid



**Figure 1** *In vitro* antimicrobial activity of culture filtrates from *Streptomyces* sp. strain OE7 and OE53 against (a) *Pectobacterium atrosepticum* (CFBP 5889) and (b) *Pectobacterium carotovorum* (CFBP 5890). (a): (—\*) OE53+*P. atrosepticum*; (—□) OE7+*P. atrosepticum* and (—◆) *P. atrosepticum*. (b): (—\*) OE53+*P. carotovorum*; (—□) OE7+*P. carotovorum* and (—▲) *P. carotovorum*.

the inhibition of the actinobacteria growth by a rapid growth of the pectobacteria using the nutrients. The co-cultures in Bennett's liquid medium were grown at 30°C, at 250 rev min<sup>-1</sup>, in the dark, for 2 more days.

CFs were obtained from the different cultures after filtration (0.2 µm) and concentration to approximately 20-fold by roto-evaporation. The final dose of CF applied to cells corresponded to 10% of the cell culture volume used, thus never exceed a twofold concentration of the molecules secreted by the strains in the Bennet medium.

### Plant cell culture conditions

*Nicotiana tabacum* BY2 cell suspensions were grown in Murashige and Skoog medium (Pauly *et al.* 2001) and maintained by weekly dilution (2/80). The cell suspension was agitated on a rotary shaker at 120 rev min<sup>-1</sup> at 22 ± 2°C in the dark. All experiments were performed at 22 ± 2°C using the cells in log phase (6 days after subculturing).

### Aequorin luminescence measurements

Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> variations were recorded from BY2 cell suspension expressing the apoaequorin gene (Pauly *et al.* 2001). For Ca<sup>2+</sup> measurement, aequorin was reconstituted by an overnight incubation of the cell suspension in Murashige and Skoog medium supplemented with 2.5 µmol l<sup>-1</sup> native coelenterazine. Cell culture aliquots (450 µl in Murashige and Skoog medium) were transferred carefully to a luminometer glass tube, and luminescence was recorded continuously at 0.2-s intervals using a FB12-Berthold luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Treatments were given by 50-µl injections containing the CF. At the end of each experiment, residual aequorin was discharged by the addition of 500 µl of a 1 mol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> solution dissolved in 100% methanol. The resulting luminescence was used to estimate the total amount of aequorin in each experiment. Calcium measurement was calibrated using the equation pCa = 0.332588(-logk) + 5.5593, where k is a rate constant equal to luminescence counts per second divided by total remaining counts (Pauly *et al.* 2001). To test the effects of each different pharmacological treatment, cell suspensions were pretreated for 15 min before the application of CF.

### Quantification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the culture medium

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release into the culture medium was quantified by measuring the chemiluminescence of luminol reacting with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jabs *et al.* 1997; Bouizgarne *et al.* 2006). Briefly, 6 ml of the BY2 cell suspension was inoculated with CF alone or with the appropriate chemical effectors.

Before each measurement, 200 µl of the cell culture was added prior to 5 µl luminol 1.1 mmol l<sup>-1</sup> addition. Chemiluminescence measurements were taken at 30-min intervals using a FB12-Berthold luminometer (signal-integrating time, 0.2 s).

### Cell viability

Cell viability was assayed using the vital dye Evans Blue (EB) (Errakhi *et al.* 2008). Five hundred microlitres of BY2 cell suspension treated with the different filtrates during different time periods was incubated for 10 min in EB to a final concentration of 0.001% in 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7. Cells that accumulated EB were considered dead. Five hundred cells were counted for each infection/treatment. All experiments were repeated at least three times.

### Dosage of scopoletin

Cells (0.5 g) were ground to a fine powder in liquid nitrogen and extracted twice with 1 ml 90% methanol. Aqueous methanol was removed by Speed-Vac and the dried residue dissolved in 120 µl of sodium acetate/acetonitrile (90 : 10; v/v) before HPLC analysis. 4-Methylumbelliferone (1 nmol) was added to each sample before extraction as an internal standard. HPLC analysis was performed on a C18 Nova Pak column (Waters, Oshawa, Ontario, Canada), using a gradient of CH<sub>3</sub>CN (A) in 20 mmol l<sup>-1</sup> sodium acetate, pH 5, at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. The gradient was 5–22% (A) for 35 min and then 22–80% (A) for 1 min. Scopoletin was detected by fluorescence (Vex 290 nm, Vem 402 nm). Identification of scopoletin was based on co-chromatography with an authentic standard coupled to a photodiode array detector (maxplot between 230 and 400 nm; Waters Millennium software). Scopoletin was quantified by comparison with the reference compounds.

The direct action of scopoletin on *Pectobacterium* viability was evaluated on microwells containing 4 µl of scopoletin dissolved in DMSO and inoculated with 196 µl of bacteria suspension in LB broth. The inoculated plates were incubated at 28°C for 24 h. All the tests were performed in triplicate.

### RT-PCR analysis of gene expression

Six-day-old cells were treated with OE7 CF, harvested and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was prepared using Trizol reagent. Total RNA was quantified by spectrophotometry, and their integrity checked on denaturing 1.2% agarose gels. Total RNA (2 µg) was converted into first-strand cDNA with the Superscript<sup>TM</sup> II Rnase H Reverse



Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) primers. One microlitre of cDNA was amplified in a 25- $\mu$ l PCR mixture with gene-specific primers for *PR1b* (Menard *et al.* 2004), *PAL*, *AOX*, *EREBP1*, *NIMIN2 $\alpha$*  and *ACT* (Koshiba *et al.* 2010) (Table 1). Control PCR was performed using the housekeeping gene *ACT*. Thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 34 cycles (or by 35 cycles for *ACT*), of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min 30 s, and ending with a single step at 72°C for 10 min. PCR products were separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide fluorescence. Representative results from two independent experiments are shown.

### Post-OE7 phytochemical challenge on tobacco BY2 cells

Tobacco BY2 cells were pretreated with OE7 CF for 0, 2 and 6 h. After pretreatment, cells were rinsed three times with culture medium to eliminate OE7 CF before inoculation with  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> of *P. carotovorum* CFBP 5890 or *P. atrosepticum* CFBP 5889. Cell viability was monitored as described earlier.

### Post-OE7 phytochemical challenge on potato slices

Fresh potato (cv. Désirée) tubers were washed and chopped into equal slices with a sterile borer. The inoculation of potato slices with either *P. carotovorum* ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) or *P. atrosepticum* ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) was carried out 24 h after application of *Streptomyces* sp. CF. Experiments were repeated five times.

### Statistical analysis

Data were analysed by analysis of variance (ANOVA), and the mean separation was achieved by Newman and Keuls

multiple range test. All numerical differences in the data were considered significantly different at the probability level of  $P \leq 0.05$ .

## Results

### *Streptomyces* sp. can activate Ca<sup>2+</sup>-mediated signalling in BY2 cells

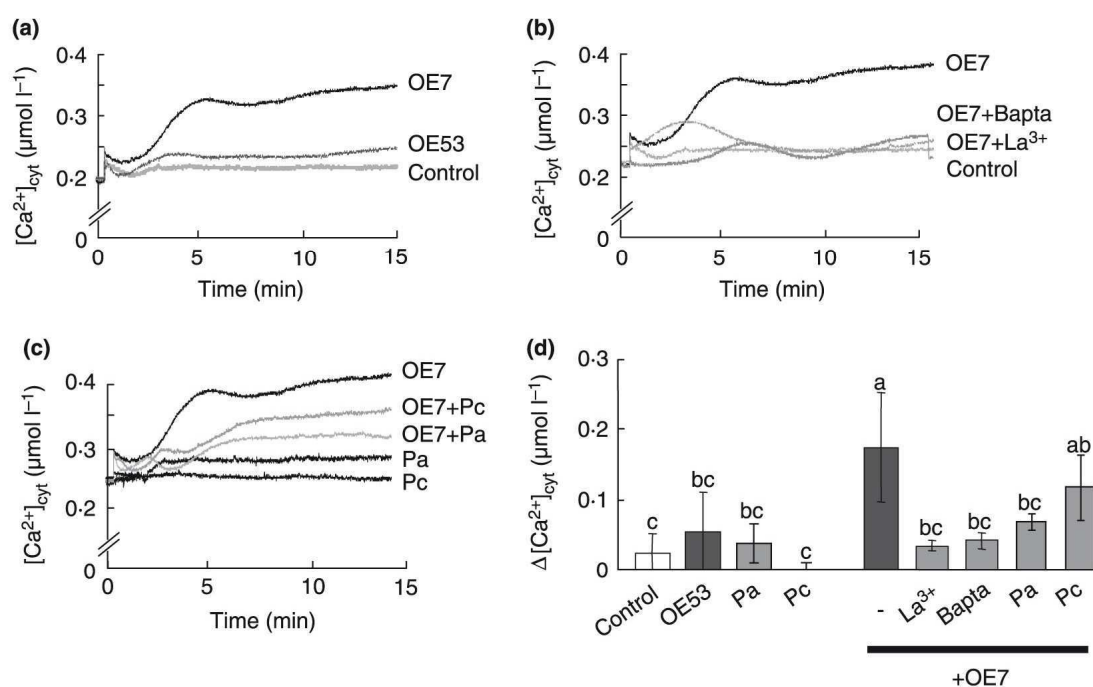
Variations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> are a well-known early component of signal transduction pathways involved in plant-microbe interactions (Lecourieux *et al.* 2006). To measure [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes, we used transgenic BY2 cells containing the bioluminescent Ca<sup>2+</sup> indicator aequorin protein in the cytosol (Pauly *et al.* 2001). Two *Streptomyces* sp. strains OE7 and OE53, isolated from Moroccan rhizospheric soils, were chosen as (i) they are nonpathogenic (Baz *et al.* 2012) and (ii) they secrete different metabolite profiles as judged by their high (strain OE7) and low (strain OE53) antimicrobial activities against *P. atrosepticum* development *in vitro* (Fig. 1a) (Baz *et al.* 2012). Both strains also counteracted *P. carotovorum* development but to a lower extent (Fig. 1b). OE7 and OE53 CF were directly applied to BY2 cells as previously described for *in vivo* bioassays of physiological effects of *Trichoderma* metabolite mixtures on plant cells (Navazio *et al.* 2007). OE7 and OE53 CF triggered an immediate slight increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> as did the Bennet's medium used as a control (Fig. 2a). Interestingly, after 5 min, only OE7 CF had induced a significant increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Fig. 2a–d) that was sustained during at least 25 min (data not shown). This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase could be abolished by either La<sup>3+</sup>, a plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor, or the Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA (Fig. 2b,d), suggesting that OE7 CF induced an influx of Ca<sup>2+</sup> through the plasma membrane. To determine whether the Ca<sup>2+</sup> increase induced by OE7 CF could be modified when the CF came from the strain grown in the presence of the pathogens *P. carotovorum* or *P. atrosepticum*, we compared CFs produced by the OE7 strain grown alone or in co-culture with these pathogenic bacteria. Culture supernatants of *Pectobacteria* alone did not induce a significant increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Fig. 2c,d), while the CF produced during the co-cultures of OE7 and *Pectobacteria* could induce a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase in the BY2 cells, albeit to a slightly decreased extent to OE7 alone (Fig. 2c,d). Such observations indicate that the synthesis of the OE7 CF component(s) that induces the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase was not avoided in the presence of the *Pectobacteria*.

### *Streptomyces* sp. can elicit oxidative bursts in BY2 cells

One of the most common plant responses to micro-organisms is an increased production of ROS (Shetty *et al.*

**Table 1** Primers used for semi-quantitative RT-PCR analyses

Gene name	Accession no.	Primers used
<i>PAL</i>	AB008199	5'-GCACAAAATGGTCACCAAGAAA-3' 5'-AAGCCATTGGGCGACGTTCTA-3'
<i>NIMIN2<math>\alpha</math></i>	AF057379	5'-AGGCATGAGAGAAAAAGTGC-3' 5'-TAACCTCCAGGATCTTCACC-3'
<i>EREBP1</i>	AF057373	5'-GGAAATTGTGGTTTCTCCAG-3' 5'-AGCTGAAGTATTTCCGACG-3'
<i>AOX</i>	S71335	5'-CACCAATGATGTTGGAAACAGTG-3' 5'-ATACCCAATTGGTCTGGAG-3'
<i>PR1b</i>	D90197	5'-GATGCCCCATAACACAGCTCG-3' 5'-TTTACAGATCCAGTTCTTCAGAGG-3'
<i>ACT</i>	AB158612	5'-AAGGTTACGCCCTTCCTCAT-3' 5'-GCCACCACCTTGATCTTCAT-3'



**Figure 2** Time course of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes in BY2 cells challenged with *Streptomyces* sp. culture filtrates. (a) Cells transformed by the apoaquorin gene were treated with CFs of *Streptomyces* sp. strains OE7 and OE53. Noninoculated Bennet's culture medium was used as a control. (b) Effect of pretreatment with the  $Ca^{2+}$  channel inhibitor  $La^{3+}$  (500 μmol l<sup>-1</sup>) or the  $Ca^{2+}$  chelator BAPTA (1 mmol l<sup>-1</sup>) on OE7 CF-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes. (c)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes induced by CF from OE7 strain cultured alone or in the presence of *Pectobacterium carotovorum* CFBP 5890 (Pc) or *Pectobacterium atrosepticum* CFBP 5889 (Pa). CFs of Pc and Pa are given as controls. (d) Means values of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  15 min after the different treatments. Data are representative of at least five independent repetitions. Bars with different superscript letters are significantly different.

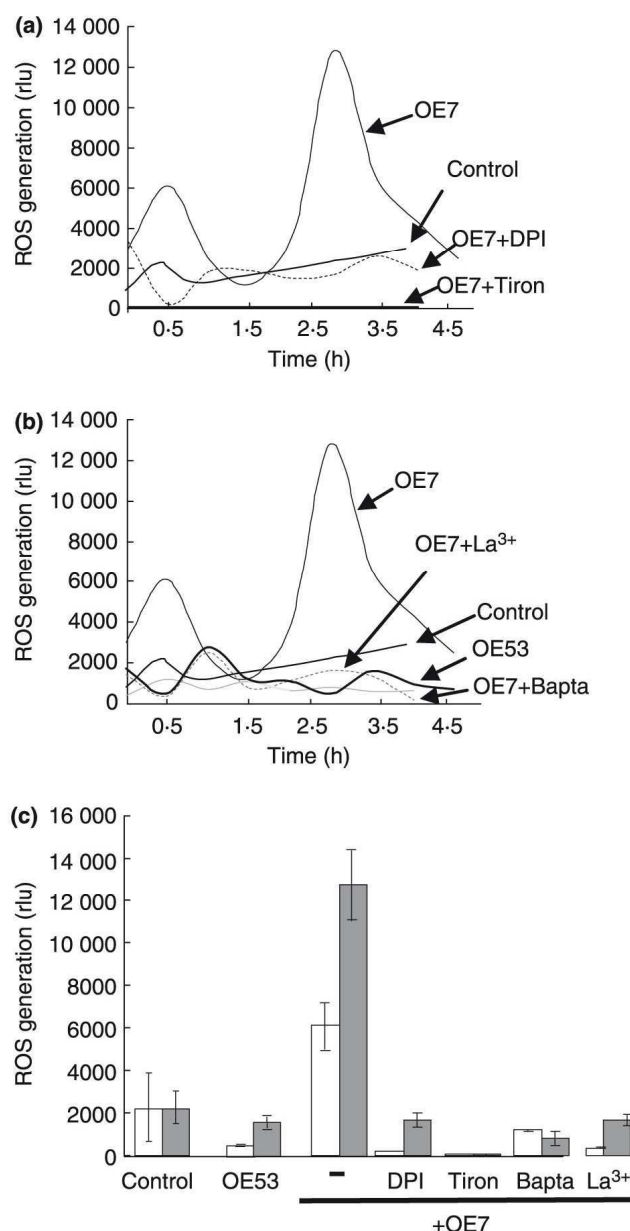
2008). Therefore, the ability of *Streptomyces* CFs to elicit  $H_2O_2$  production in BY2 cells was investigated. The BY2 cells treated with OE7 CF showed a biphasic increase in luminol-mediated chemiluminescence caused by  $H_2O_2$  release into the culture medium (Fig. 3a). A first oxidative burst peaked after 30 min, followed by a larger one that reached a maximum at around 3 h. Both returned to the control level after 1.5 and 5 h, respectively. This  $H_2O_2$  production was blocked by the  $O_2^-$  scavenger tirion (5 mmol l<sup>-1</sup>) and the NADPH oxidase inhibitor DPI (10 μmol l<sup>-1</sup>), suggesting that plasma membrane NADPH oxidases were involved in the  $H_2O_2$  production (Fig. 3a,c). The attenuation of the oxidative bursts by either  $La^{3+}$  or BAPTA, which limit  $Ca^{2+}$  influx, suggested that  $H_2O_2$  generation occurred downstream from the CF-induced  $Ca^{2+}$  changes (Fig. 3b,c). Cell suspensions treated with the OE53 CF showed no significant increase in external  $H_2O_2$  levels during the time course of the experiments (Fig. 3b,c), in accordance with the nonsignificant  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  variations attributed to the OE53 CF treatment (Fig. 2a).

### OE7-induced programmed cell death of BY2

Both intracellular  $Ca^{2+}$  overload and  $H_2O_2$  release may cause PCD (Hoeberichts and Woltering 2003). Because

OE7 CF induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  and ROS increases, its effect on cell viability was determined. Based on EB staining, OE7 CF significantly increased the percentage of dead cells after 24 h. On the other hand, while CFs of *P. carotovorum* and *P. atrosepticum* did not induce cell death (Fig. 4a), CF produced by the OE7 strain grown in co-culture with these bacteria also induced cell death, confirming that the synthesis of the CF component(s) required to induce cell death was secreted even in the presence of the pathogenic bacteria (Fig. 4a). This cell death was accompanied by a strong cell plasmolysis (Fig. 4b), a hallmark of PCD (van Doorn et al. 2011). To check whether the induction of cell death was an active mechanism requiring gene expression and cellular metabolism as expected during PCD (Lam 2004), BY2 cell suspensions were pretreated either with actinomycin D (AD), an inhibitor of RNA synthesis, or with cycloheximide (Chx), an inhibitor of protein synthesis. Although the pretreatment of BY2 cells with these inhibitors resulted in a slight increase of cell death compared with the control, AD and Chx reduced OE7 CF-induced cell death by about 50% (Fig. 4c), thus indicating that active cell metabolism, namely gene transcription and *de novo* protein synthesis, was required, suggesting a PCD process (Vacca et al. 2004; Kadono et al. 2010). In addition, the





**Figure 3** Time course of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in BY2 cells challenged with *Streptomyces* sp. culture filtrates. (a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the cell culture medium treated with OE7 CF with or without the NADPH oxidase inhibitor DPI (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) or the O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger tiron (5 mmol l<sup>-1</sup>). (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the cell culture medium treated with OE7 CF with or without the Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor La<sup>3+</sup> (500  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) or the calcium chelator BAPTA (1 mmol l<sup>-1</sup>), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the cell culture medium treated with OE53 CF. (c) Means values of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation after 30 min and 3 h for the different treatments. Noninoculated Bennet's culture medium was used as a control. The data correspond to the means of five replicates, and error bars correspond to SD. (□) 30 min and (■) 3 h.

effect of OE7 on cell death in the presence or the absence of La<sup>3+</sup> or BAPTA was tested. The pretreatment of BY2 cells with either La<sup>3+</sup> or BAPTA caused a slight increase

in cell death compared with the control. However, both treatments reduced the cell death induced by the CF of OE7 (Fig. 4d). In the same way, OE7-induced cell death was also decreased in the presence of tiron (5 mmol l<sup>-1</sup>) (Fig. 4d). Taken together, these data strongly suggest that OE7 induces PCD as a defence response and that Ca<sup>2+</sup> influx and ROS generation are upstream events in the signalling pathway leading to this process.

#### OE7 induced an accumulation of scopoletin in BY2 cells

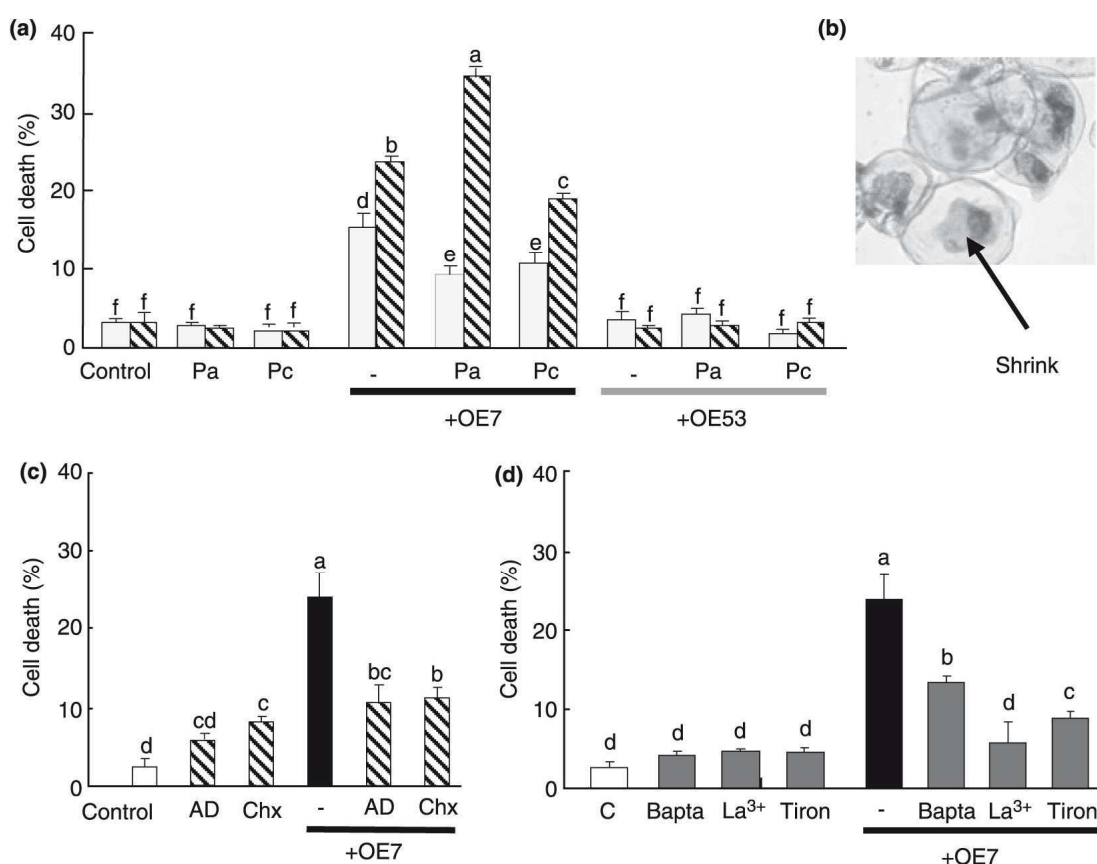
The generation of ROS and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> variations is also known to play a role in the HR, a form of PCD associated with the induction of phytoalexins like scopoletin (Greenberg 1997). Therefore, the induction of scopoletin synthesis in response to OE7 was tested using the BY2 cell system. The levels of free intracellular scopoletin in BY2 cells were determined after 0, 2, 4, 6 and 14 h of OE7 CF treatment. Scopoletin levels were low during the first 6 h post-treatment, but significantly increased to about 0.5 nmol g<sup>-1</sup> of fresh cells after 14 h (Fig. 5a). Coumarins, like scopoletin, are known to be effective against Gram-negative bacteria (Cespedes *et al.* 2006); therefore, the action of scopoletin on *P. carotovorum* and *P. atrosepticum* growth was checked. Scopoletin effectively inhibited the growth of these *Pectobacteria* in a dose-dependent manner after 24 h (Fig. 5b).

#### OE7-induced expression of defence response genes in BY2 cells

Defence responses are often concomitant with an increase in the expression of defence-related genes. We analysed by RT-PCR the accumulation of several gene transcripts in response to OE7 CF: *PAL*, which encodes phenyl ammonia-lyase, a key enzyme of the phenylpropanoid biosynthetic pathway; *PR1b* (pathogenesis-related) and *NIMIN2α* involved in the salicylic acid (SA) defence signalling pathways (Glocova *et al.* 2005); and *EREBP1* and *AOX* involved in the ethylene (ET) defence signalling pathways (Chang and Shockey 1999; Ederli *et al.* 2006). As expected from the production of scopoletin by the BY2 cells, an increase in *PAL* mRNA levels was observed after a 14-h OE7 treatment. An increase in mRNA levels was also detected for *EREBP1* and *AOX* (Fig. 6). A constitutive expression was observed for *PR1b* and *NIMIN2α* because OE7 treatment did not increase the transcript levels of these genes (Fig. 6).

#### OE7 CF protected BY2 cells against *Pectobacterium* spp.

We recently demonstrated that suspension cells could be an alternative tool to evaluate rapidly and efficiently the



**Figure 4** Changes in BY2 cell viability in response to *Streptomyces* sp. culture filtrates (CFs). Exponentially growing cells were incubated with *Streptomyces* sp. CFs for 24 h and stained with Evans Blue (EB). (a) Extent of cell death for cells treated with CF from OE7 and OE53 cultured alone or co-cultured with *P. carotovorum* (Pc) or *P. atrosepticum* (Pa). Control cells were incubated with Bennet's culture medium only (b). Light micrographs of BY2 cells stained with EB 24 h after treatment with *Streptomyces* sp. strain OE7 CF. (c) Effect of pretreatment with actinomycin D (AD, 20 mg ml<sup>-1</sup>) or cycloheximide (Chx, 20 mg ml<sup>-1</sup>) on OE7-induced cell death. (d) Effect of a pretreatment with La<sup>3+</sup> (500 μmol l<sup>-1</sup>), BAPTA (1 mmol l<sup>-1</sup>) or tiron (5 mmol l<sup>-1</sup>) on OE7-induced cell death. The data correspond to the means of at least three replicates, and error bars correspond to standard errors. Bars labelled with a different letter are significantly different. (□) 5 h and (▨) 24 h.

virulence of different *P. carotovorum* strains (Terta et al. 2010). We thus checked whether the OE7-induced defence responses protected cells from a *P. carotovorum* or *P. atrosepticum* postchallenge. To avoid any direct effect of OE7 on *Pectobacterium* growth, BY2 cells were rinsed three times with culture medium to remove the OE7 CF before performing the postchallenge. In these conditions, BY2 cell death caused by *P. carotovorum* and *P. atrosepticum* was significantly reduced when the cells were pretreated with OE7 CF (Fig. 7a), suggesting that the OE7-induced defence responses participated in limiting *Pectobacterium* virulence.

#### OE7 CF protected potatoes from *Pectobacterium*-induced soft rot symptoms

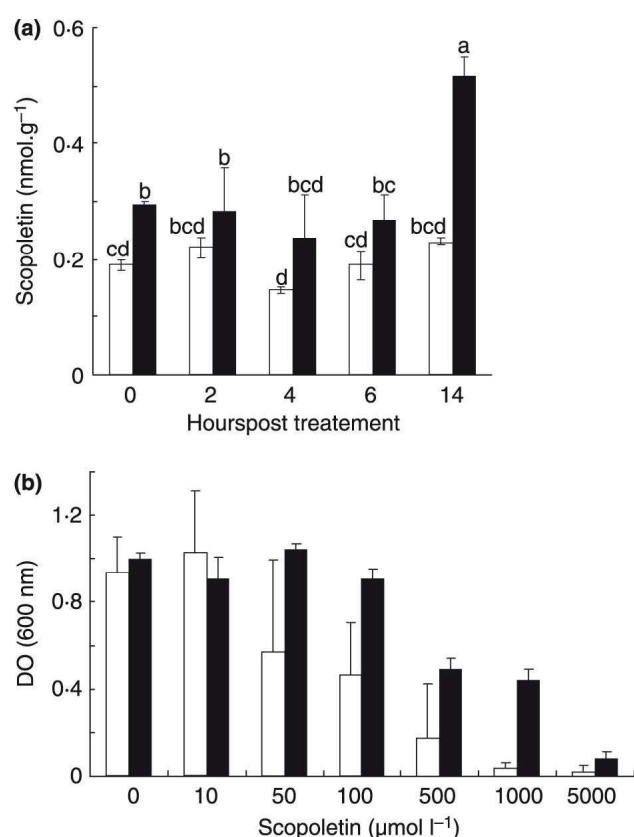
To determine whether the elicitation of defence responses also had an effect on *Pectobacterium*-induced soft rot

symptoms on potato, tuber slices were pretreated with OE7 CF before challenging them with the potato rot pathogens, *P. carotovorum* and *P. atrosepticum*. Tissue rot in tubers inoculated with *P. carotovorum* and *P. atrosepticum* was lower in OE7 CF-treated tubers compared with those treated only with either *P. carotovorum* or *P. atrosepticum* (Fig. 7b).

#### Discussion

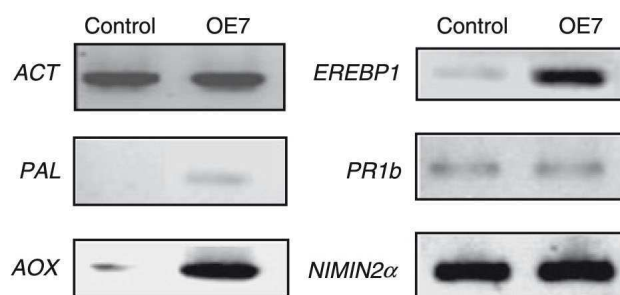
The aim of this study was to investigate the metabolic events induced when plant cells perceive rhizospheric nonpathogenic *Streptomyces* sp. One of the most direct ways to have an overview of the complex reactions and effects caused by *Streptomyces* sp. in plants is to assay the impact of the metabolic mixture contained in the CF on markers linked to plant defence such as variations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>, ROS generation, phytoalexin production and



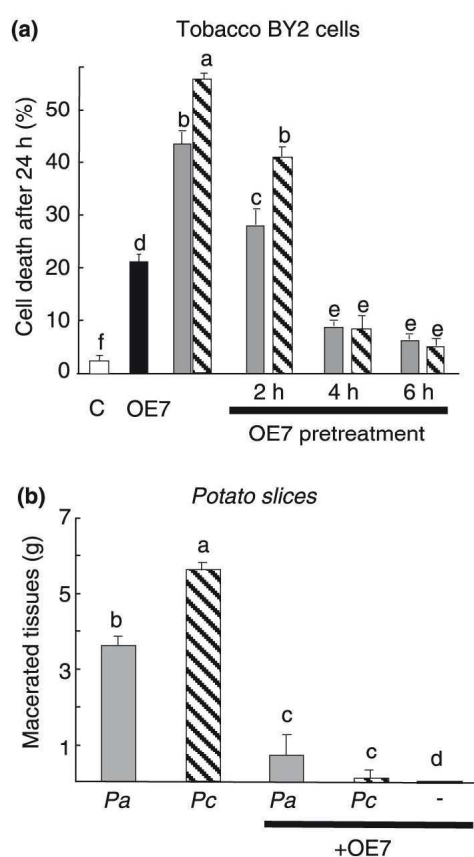


**Figure 5** (a) Levels of free intracellular scopoletin in BY2 cells elicited by OE7 CF. The data correspond to the means of 3 replicates, and standard errors are given. Bars labelled with a different letter are significantly different. (b) Effect of scopoletin on the growth of *Pectobacterium carotovorum* CFBP 5890 (Pc) or *Pectobacterium atrosepticum* CFBP 5889 (Pa) after 24 h. The culture was inoculated with 10<sup>6</sup> CFU bacteria before treatment. (□) *P. carotovorum* and (■) *P. atrosepticum*.

changes in defence-related gene expression. Because a simplified model offers several advantages in the dissection of such complex cellular responses (Navazio *et al.* 2007; Terta *et al.* 2010), tobacco BY2 cell suspensions challenged with actinobacteria CFs were used as a simplified experimental model. Possible modifications in the pattern of the secreted molecules were analysed by testing the effects of CFs from *Streptomyces* sp. strains co-cultured with the phytopathogenic *P. carotovorum* and *P. atrosepticum*. Our approach allowed to highlight a sustained influx of Ca<sup>2+</sup> as an early step during the interaction of BY2 cells with OE7 CF. Although the role of Ca<sup>2+</sup> in plant defence signalling is firmly established (Lecourieux *et al.* 2006), to our knowledge, this is the first report of Ca<sup>2+</sup> influx in plant cells induced by nonpathogenic *Streptomyces* sp. In the same way, a biphasic oxidative burst reminiscent of the oxidative burst associated with incompatible plant–pathogen interactions (Levine



**Figure 6** Effect of a 14-h treatment with OE7 CF on the expression of defence-related genes (PAL, PR1b, NIMIN2α, EREBP1 and AOX). ACT, actin, was used as a constitutive control.



**Figure 7** (a) Effect of pretreatment with OE7 CF on cell death induced by *Pectobacterium carotovorum* CFBP 5890 (Pc) or *Pectobacterium atrosepticum* CFBP 5889 (Pa) on BY2 cells after 24 h. (b) Mean rot weight 48h after inoculation of tubers slices of potato cv. Désirée with *P. carotovorum* (Pc) or *P. atrosepticum* (Pa) treated or not with OE7 CF. Control tubers treated with OE7 CF alone displayed no rot symptoms. Bars with different superscript letters are significantly different. (■) *P. atrosepticum* and (▨) *P. carotovorum*.

*et al.* 1994) and induced in sugar beet by the biological control agent *Bacillus mycoides* (Bargabus *et al.* 2003) was also observed in response to the OE7 CF. The attenuation of this oxidative burst by the O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger tiron and the

NADPH oxidase inhibitor DPI suggested that  $O_2^-$  was generated via an NADPH oxidase activity. It should be noted that OE7-induced ROS generation was dependent on  $Ca^{2+}$  influx and that the CF from the less-efficient OE53 strain failed to induce  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  variations and ROS generation. Calcium influx and ROS generation are frequently linked to plant-pathogen responses (Ishihara et al. 1996; Jabs et al. 1997; Able et al. 2001; Errakhi et al. 2008), and they are required to induce defence-related genes, to stimulate phytoalexin biosynthesis and to promote hypersensitive cell death (Low and Merida 1996). Indeed, it was found that OE7 induced the accumulation of transcripts coding for PAL, a key enzyme of the phenylpropanoid pathway, and the synthesis of the scopoletin, a phytoalexin derived from L-phenylalanine via this pathway (Dorey et al. 1997; Chong et al. 2002). Scopoletin displays well-recognized antimicrobial activities against various plant pathogens (Chong et al. 2002; Lerat et al. 2009), and we found that scopoletin, known to be efficient against Gram-negative bacteria (Cespedes et al. 2006), inhibited *Pectobacterium* growth *in vitro*. OE7 CF also induced BY2 cell death, which fulfilled the widely accepted criteria for PCD, that is, cell plasmolysis and the requirement of active transcription and translation processes (Lam 2004; van Doorn et al. 2011). This PCD, dependent on  $Ca^{2+}$  influx and ROS generation, could consist in a defence response. In accordance with the  $Ca^{2+}$  and ROS dependence of the OE7 CF-induced cell death, the CF from the weakly efficient OE53 strain failed to induce cell death in BY2 cells. However, the OE7 CF-induced cell death concerns <30% of the cells, suggesting that the signalling pathway leading to this PCD was not induced in all cells. Our BY2 cell cultures being not synchronized and in log phase, the PCD induced by OE7 CF could be due to a cell cycle phase-dependent sensitivity as described for BY2 cell death induced by cryptogein (Kadota et al. 2004). It is noteworthy that in BY2 cells, the ROS generation was independent of the cell cycle (Kadota et al. 2004), indicating that defence response occurs in all cells independently of PCD. This suggests that cell death was only a part of cell response to cryptogein. The PCD induced by OE7 CF could reflect the ability of some BY2 cells to engage a specific signalling pathway in the network of defence responses.

In the control experiment, the genes *PR1b* and *NI-MIN2α*, involved in the SA defence signalling pathways (Glocova et al. 2005), as well as the genes *EREBP1* and *AOX*, known to be related to the defence signalling pathways induced by ET (Chang and Shockey 1999; Ederli et al. 2006), were already induced. This indicates that in our model system these pathways, known to interact in response to biotic but also abiotic stress (Wang et al. 2002), could be constitutively activated, at least to a

basal level, probably due to culture conditions. However, no increase in the transcript levels of *PR1b* and *NI-MIN2α* was observed in response to OE7 in BY2 cells, when accumulation of *EREBP1* and *AOX* transcripts could be observed. Although it is thus difficult to conclude on the involvement of SA signalling pathways in response to OE7 CF in these conditions, our data suggest that OE7-secreted molecules could reinforce a pathway related to induced systemic resistance (ISR), because signal transduction leading to ISR requires responsiveness to ET and jasmonate rather than to SA (Yan et al. 2002; Choudhary and Johri 2009). This interpretation should be considered with caution and requires further investigation because, in addition to a possible basal activation of SA-related and ET/JA-related pathways, the OE7-induced responses were local reactions measured in suspension cells, whereas ISR is a systemic response. However, taken together, our data suggest that the OE7 strain can induce early and delayed defence responses in BY2.

To check whether these defence responses participate in protecting the cell against a pathogen attack, the impact of OE7 CF pretreatments on *P. carotovorum*- and *P. atrosepticum*-induced BY2 cell death was tested. Recently, we showed that cell death induced by these pathogens in cultured suspensions was reminiscent of the pathogen-induced effects on potatoes because this cell death involved pectinolytic enzymes that induced a complete degradation of the cell structures (Terta et al. 2010). Indeed, pretreatments with OE7 CF were efficient in reducing the extent of cell death induced by such pathogenic bacteria in BY2 cells. Thus, despite the fact that OE7 CF could induce a slight PCD in BY2 cell population, the global effect on pathogen challenge was positive because *P. carotovorum*- and *P. atrosepticum*-induced BY2 cell death was reduced by pretreatment with this CF. These data further indicate that suspension cells are a good model to study 'in vitro' biocontrol processes'. Resistance to pathogen attacks by crops is the ultimate objective of biocontrol experiments, and therefore, the reliability of our observations using suspension cells was evaluated by testing the ability of OE7 CF to limit the extent of soft rot symptoms on potato slices. As observed for suspension cells, OE7 CF could reduce the extent of *P. carotovorum*- and *P. atrosepticum*-induced symptoms on potato tubers. Thus, our data provide good evidence that, in addition to direct antagonism, OE7 CF participate in attenuating disease by elicitation of plant defence responses, thereby highlighting the potential of the non-pathogenic OE7 strain for biological control against *Pectobacterium* species. Although the Bennet medium used to grow the OE7 strain is supposed to promote the antibiotic production (Badji et al. 2007), further studies will be



needed to determine (i) which compound(s) of the CF is responsible for the effects seen in the tobacco cell culture, (ii) whether the same compound(s) could reduce pathogen development and induce plant defence responses and (iii) finally, whether such compound(s) could effectively be produced when the *Streptomyces* strain colonizes the rhizosphere of the plant.

## Acknowledgements

This work was supported by the Agronomic Research for Development Project PRAD no. 07-07 and the Moroccan Excellence grant no. E3/003. BY2 cells were kindly provided by C. Mazars (UMR CNRS-UPS, Toulouse). Authors thank M. Hodges and K. Massoud (IBP, Orsay) for critical reading of the manuscript.

## References

- Able, A.J., Guest, D.I. and Sutherland, M.W. (2001) Relationship between transmembrane ion movements, production of reactive oxygen species and the hypersensitive response during the challenge of tobacco suspension cells by zoospores of *Phytophthora nicotianae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **58**, 189–198.
- Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E. and Tillequin, F. (2007) Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 403–412.
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K. and Beaulieu, C. (2002) Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microbiol Biotechnol* **18**, 49–54.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. and Jacobsen, B.J. (2003) Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 1145–1153.
- Baz, M., Lahbabi, D., Samri, S., Val, F., Hamelin, G., Madore, I., Bouarab, K., Beaulieu, C. et al. (2012) Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 303–311.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouverie, J. et al. (2006) Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytol* **169**, 209–218.
- Céspedes, C.L., Avila, J.G., Martinez, A., Serrato, B., Calderon-Mugica, J.C. and Salgado-Garciglia, R. (2006) Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem* **54**, 3521–3527.
- Chang, C. and Shockey, J.A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 352–358.
- Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T. and Schrempf, H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 171–198.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. and Saindrenan, P. (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**, 1093–1107.
- Choudhary, D.K. and Johri, B.N. (2009) Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res* **164**, 493–513.
- Conn, V.M., Walker, A.R. and Franco, C.M. (2008) Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 208–218.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M. (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5603–5608.
- Dodd, A.N., Kudla, J. and Sanders, D. (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 593–620.
- van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M. et al. (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* **18**, 1241–1246.
- Dorey, S., Baillieu, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 646–655.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L. et al. (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol* **142**, 595–608.
- El-Tarabily, K.A. (2006) Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can J Bot* **84**, 211–222.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A. and Barakate, M. (2007) Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 1503–1509.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P. et al. (2008) An early Ca<sup>2+</sup> influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *J Exp Bot* **59**, 4259–4270.
- Franco, C., Michelsen, P., Percy, N., Conn, V., Listiana, E., Moll, S. et al. (2007) Actinobacterial endophytes for improved crop performance. *Australas Plant Pathol* **36**, 524–531.

- Glocova, I., Thor, K., Roth, B., Babbick, M., Pfitzner, A.J.P. and Pfitzner, U.M. (2005) Salicylic acid (SA)-dependent gene activation can be uncoupled from cell death-mediated gene activation: the SA-inducible NIMIN-1 and NIMIN-2 promoters, unlike the PR-1a promoter, do not respond to cell death signals in tobacco. *Mol Plant Pathol* **6**, 299–314.
- Greenberg, J.T. (1997) Programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 525–545.
- Hoeberichts, F.A. and Woltering, E.J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* **25**, 47–57.
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Kuwahara, Y., Ueno, T. and Mayama, S. (1996) Involvement of Ca<sup>2+</sup> ion in phytoalexin induction in oats. *Plant Sci* **115**, 9–16.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4800–4805.
- Jones, K.L. (1949) Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelium is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol* **57**, 141–145.
- Kadono, T., Tran, D., Errakhi, R., Hiramatsu, T., Meimoun, P., Briand, J., Iwaya-Inoue, M., Kawano, T. et al. (2010) Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS ONE* **5**, e13373.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K. (2004) Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J* **40**, 131–142.
- Karlovsky, P., Tarkka, M. and Hampp, R. (2008) Secondary Metabolites of Soil Streptomyces in Biotic Interactions. In *Secondary Metabolites in Soil Ecology* ed. Karlovsky, P. pp. 107–126 Berlin, Heidelberg: Springer.
- Koshiba, T., Kobayashi, M., Ishihara, A. and Matoh, T. (2010) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 Cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. *Plant Cell Physiol* **51**, 323–327.
- Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 305–315.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2006) Calcium in plant defense-signalling pathways. *New Phytol* **171**, 249–269.
- Lehr, N.A., Schrey, S.D., Hampp, R. and Tarkka, M.T. (2008) Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol* **177**, 965–976.
- Lerat, S., Babana, A.H., El Oirdi, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Beaudoin, N. et al. (2009) *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **28**, 1895–1903.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583–593.
- Low, P.S. and Merida, J.R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**, 533–542.
- Menard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B. et al. (2004)  $\beta$ -1,3 glucan sulfate, but not  $\beta$ -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3020–3032.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S.L., Mariani, P. et al. (2007) Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol* **7**, 41.
- Park, S.Y., Kang, H.O., Jang, H.S., Lee, J.K., Koo, B.T. and Yum, D.Y. (2005) Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2632–2641.
- Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., Graziana, A., Muto, S., Ranjeva, R. et al. (2001) The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* **30**, 413–421.
- Shetty, N.P., Jorgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B. and Shetty, H.S. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol* **121**, 267–280.
- Terta, M., Kettani-Halabi, M., Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'Hand R, A. et al. (2010) *Arabidopsis thaliana* cells: a model to evaluate the virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 139–143.
- Vacca, R.A., de Pinto, M.C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E. and De Gara, L. (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **134**, 1100–1112.
- Verhagen, B.W.M., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Hofte, M. and Aziz, A. (2010) *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defense responses in grapevine. *J Exp Bot* **61**, 249–260.
- Wang, K.L.C., Li, H. and Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**(Suppl), S131–S151.
- Yan, Z.N., Reddy, M.S., Ryu, C.M., McInroy, J.A., Wilson, M. and Kloepper, J.W. (2002) Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **92**, 1329–1333.

## Résumé

Les bactéries *Pectobacterium* sont classées parmi les agents pathogènes les plus importants économiquement pour la culture de la pomme de terre. Au cours des dernières années, une augmentation des maladies dues à ces bactéries a pu être observée. Le but de ce travail de thèse était d'analyser certains aspects de la diversité liés aux *Pectobacterium* sp à savoir : (i) la diversité génétique liée aux régulateurs du pouvoir pathogène de la bactérie (ii) la diversité de virulence et d'agressivité des souches de *Pectobacterium* vis-à-vis de leurs hôtes et (iii).le rôle et la diversité des effets induits par le lipopolysaccharides (LPS), composants de la surface bactérienne de bactéries phytopathogène ou non phytopathogène. Ce travail de thèse souligne également le rôle potentiel que pourrait jouer ces molécules LPS dans le biocontrôle des *Pectobacterium* sp. Différentes expérimentations cellulaires et moléculaires allant de l'identification de la bactérie à la compréhension des voies de signalisation ont été utilisées. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer, en premier lieu que, le séquençage du gène *pmrA*, gène connu pour être impliqué dans la régulation du pouvoir pathogène des *Pectobacterium*, est un outil moléculaire complémentaire d'identification de sous espèces de *Pcc* et pourrait être aussi un moyen efficace d'évaluation de la diversité génétique intra-spécifique. Dans un second temps, nous avons montré que les cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* pourraient être un modèle végétal d'évaluation de l'agressivité des *Pectobacterium*. Ceci a été obtenu par quantification des cinétiques de trois paramètres associés à la pathogénie de ces bactéries à savoir : l'activité des pectate-lyases, déterminant majeur du pouvoir pathogène des *Pcc*, la fuite des électrolytes, considérée comme un marqueur précoce de la mort cellulaire, et la mort cellulaire des cultures elle-même. Enfin nous avons également montré que les effets induits par les LPS chez les cellules d'*Arabidopsis thaliana* sont dépendant du type bactérien. En effet Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence trois types de réponses différentes aux LPS en fonction de leur origine: les réponses identiques (régulation des flux d'ions), des réponses communes mais présentant des intensités et de cinétiques différentes (production de ROS, induction de gènes de défense) et des réponses spécifiques (induction d'une PCD, alcalinisation du milieu). Ces résultats indiquent que différentes voies de signalisation pourraient être activées chez *Arabidopsis thaliana*. Ils nous ont permis également de mieux comprendre l'implication des LPS dans le biocontrôle contre les *Pectobacterium* sp.

**Mots clés :** *Pectobacterium*, Pomme de terre, *Arabidopsis thaliana*, LPS, Signalisation cellulaire, Biocontrôle.